

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01814057.2

C07K 14/435

C07K 14/47 C07K 14/475

C07K 14/50 C07K 16/22

C07K 16/26 C12N 5/10

C12N 15/12 C12N 15/16

C12N 15/18 C12N 15/62

C12N 15/63 A61K 38/16

[11] 公开号 CN 1446227A

[43] 公开日 2003 年 10 月 1 日

[22] 申请日 2001.7.10 [21] 申请号 01814057.2

[30] 优先权

[32] 2000.7.19 [33] US [31] 60/219,137

[86] 国际申请 PCT/US01/21738 2001.7.10

[87] 国际公布 WO02/08271 英 2002.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2003.2.12

[71] 申请人 先端研究与技术学院

地址 美国印第安纳州

共同申请人 慕尼黑路德维希-马克西米利安斯
大学遗传医学部

[72] 发明人 M·艾肯斯 K·怀特

T·M·斯特罗姆 T·梅廷格尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

A61K 38/17 A61K 38/18

A61K 38/22 A61K 48/00

C12Q 1/68 G01N 33/53

G01N 33/567

权利要求书 7 页 说明书 63 页 序列表 21 页
附图 19 页

[54] 发明名称 新型成纤维细胞生长因子 (FGF23)
及其使用方法

[57] 摘要

本发明涉及编码成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 的新型核酸及由其编码的蛋白质, 它的突变与常染色体显性低血磷佝偻病 (ADHR) 有关。本发明还涉及诊断和治疗低血磷和高血磷紊乱的方法, 包括分别抑制或刺激患者体内 FGF23 的生物学活性。本发明还涉及治疗骨质疏松、皮炎、和冠状动脉疾病的方法, 包括刺激患者体内 FGF23 的生物学活性。

ISSN 1008-4274

1. 编码成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 或其突变体、变体、同系物、或片段的分离核酸。
2. 编码成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 的分离核酸, 其中所述分离核酸与 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 3 之至少一项的核酸序列共享至少大约 50% 的序列同一性。
3. 编码成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 的分离核酸, 其中所述分离核酸编码一种多肽, 该多肽具有与 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 之至少一项的氨基酸序列共享至少 40% 的序列同一性的氨基酸序列。
4. DSMZ 保藏号 DSM 13530 中包含的分离核酸。
5. 权利要求 1 的分离核酸, 所述核酸还包含与其共价连接的编码标签多肽的核酸。
6. 权利要求 5 的分离核酸, 其中所述标签多肽选自下组: myc 标签多肽、谷胱甘肽-S-转移酶标签多肽、绿色荧光蛋白标签多肽、myc-丙酮酸激酶标签多肽、His6 标签多肽、流感病毒血凝素标签多肽、FLAG 标签多肽、和麦芽糖结合蛋白标签多肽。
7. 权利要求 1 的分离核酸, 所述核酸还包含与其可操作连接的表述启动子/调控序列的核酸。
8. 包含权利要求 1 的分离核酸的载体。
9. 权利要求 8 的载体, 所述载体还包含与其可操作连接的表述启动子/调控序列的核酸。
10. 包含权利要求 1 的分离核酸的重组细胞。
11. 包含权利要求 8 的载体的重组细胞。
12. 与编码成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 或其突变体、变体、同系物、或片段的核酸互补的分离核酸, 所述互补核酸处于反义取向。
13. 权利要求 12 的分离核酸, 其中所述互补核酸与具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 3 之至少一项的核酸序列的核酸的互补核酸共

享至少大约 50 % 的序列同一性。

14. 包含权利要求 12 的分离核酸的载体。

15. 权利要求 14 的载体, 所述载体还包含与其可操作连接的表述启动子/调控序列的核酸。

16. 包含权利要求 12 的分离核酸的重组细胞。

17. 包含编码成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 或其突变体、变体、同系物、或片段的分离核酸的转基因非人哺乳动物。

18. 包含成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 或其突变体、变体、同系物、或片段的分离多肽。

19. 权利要求 18 的分离多肽, 其中所述 FGF23 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 之至少一项的氨基酸序列共享至少大约 40 % 的序列同一性。

20. 特异结合成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 多肽或其突变体、变体、同系物、或片段的抗体。

21. 权利要求 20 的抗体, 其中所述抗体选自下组: 多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、和合成抗体。

22. 编码成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 的分离核酸, 其中所述核酸包含突变。

23. 权利要求 22 的分离核酸, 其中所述突变赋予所述 FGF23 以升高的稳定性。

24. 权利要求 22 的分离核酸, 其中所述突变选自下组: 核酸中编码相对于 SEQ ID NO: 2 的第 176 位氨基酸 (精氨酸) 的突变和核酸中编码相对于 SEQ ID NO: 2 的第 179 位氨基酸 (精氨酸) 的突变。

25. 分离的成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 多肽, 其中所述多肽包含突变。

26. 分离的成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 多肽, 所述多肽包含赋予所述 FGF23 以升高的稳定性的突变。

27. 权利要求 26 的分离多肽, 其中所述突变选自下组: 相对于 SEQ ID NO: 2 的第 176 位氨基酸 (精氨酸) 处的突变和相对于 SEQ ID

NO: 2 的第 179 位氨基酸(精氨酸)处的突变。

28. 成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 的抑制剂, 其中所述抑制剂选自下组: 降低编码 FGF23 多肽的 mRNA 水平的分子、降低 FGF23 多肽水平的分子、和降低 FGF23 生物学活性的分子。

29. 权利要求 28 的抑制剂, 其中所述抑制剂选自下组: 反义核酸、核酶、抗体、肽、和肽模拟物。

30. 权利要求 28 的抑制剂, 其中所述抑制剂是选自下组的抗体: 可特异结合 FGF23 的抗体和可特异结合 FGF23 受体的抗体。

31. 权利要求 28 的抑制剂, 其中所述抑制剂是可通过 RNA 干扰来降低编码 FGF23 多肽的所述 mRNA 水平的双链 RNA。

32. 包含权利要求 1 的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

33. 包含权利要求 12 的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

34. 包含权利要求 18 的分离多肽和制药学可接受载体的组合物。

35. 包含权利要求 20 的抗体和制药学可接受载体的组合物。

36. 包含权利要求 22 的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

37. 包含权利要求 23 的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

38. 包含权利要求 24 的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

39. 包含权利要求 25 的分离 FGF23 多肽和制药学可接受载体的组合物。

40. 包含权利要求 26 的分离 FGF23 多肽和制药学可接受载体的组合物。

41. 包含权利要求 27 的分离 FGF23 多肽和制药学可接受载体的组合物。

42. 包含权利要求 28 的抑制剂和制药学可接受载体的组合物。

43. 生成具有成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 的生物学活性的分离蛋白质的方法, 包括: (1) 在所述蛋白质得以表达的条件下培养权利要求 11 的重组细胞; 并(2)回收所述蛋白质。

44. 诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的方法, 包括: (1) 由所述哺乳动物获得生物学样品; 并(2)使所述生物学样品接触能够检测编码成

纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 的核酸中是否存在突变的试剂, 其中所述突变的存在指示所述哺乳动物患有所述低血磷紊乱, 由此诊断所述哺乳动物体内的所述低血磷紊乱。

45. 权利要求 44 的方法, 其中所述低血磷紊乱是常染色体显性低血磷佝偻病 (ADHR)。

46. 权利要求 44 的方法, 其中所述生物学样品选自下组: 血液和尿液。

47. 权利要求 44 的方法, 其中所述试剂是核酸。

48. 权利要求 44 的方法, 其中所述试剂被可检测标记。

49. 权利要求 44 的方法, 其中所述试剂被选自下组的标记物可检测标记: 放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物、和酶。

50. 诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的方法, 包括: (1) 由所述哺乳动物获得生物学样品; 并(2)使所述生物学样品接触能够检测是否存在突变型成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 多肽的试剂, 其中所述突变型 FGF23 多肽的存在指示所述哺乳动物患有所述低血磷紊乱, 由此诊断所述哺乳动物体内的所述低血磷紊乱。

51. 权利要求 50 的方法, 其中所述低血磷紊乱是常染色体显性低血磷佝偻病 (ADHR)。

52. 权利要求 50 的方法, 其中所述生物学样品选自下组: 血液和尿液。

53. 权利要求 50 的方法, 其中所述试剂是抗体。

54. 诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的方法, 包括: (1) 由所述哺乳动物获得生物学样品; 并(2)使所述生物学样品接触能够检测所述样品中成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 多肽水平的试剂, 其中所述样品中 FGF23 多肽水平相对于由对照哺乳动物获得的样品中 FGF23 多肽水平的升高指示所述哺乳动物患有所述低血磷紊乱, 由此诊断所述哺乳动物体内的所述低血磷紊乱。

55. 权利要求 54 的方法, 其中所述低血磷紊乱选自下组: X 连锁

遗传性佝偻病 (XLH)、遗传性低血磷佝偻病 (HHRH)、低血磷骨病 (HBD)、常染色体显性低血磷佝偻病 (ADHR)、由肿瘤诱导的骨软化、表皮痣综合症、纤维性发育不良、和肾结石。

56. 权利要求 54 的方法, 其中所述生物学样品选自下组: 血液和尿液。

57. 权利要求 54 的方法, 其中所述试剂是 FGF23 抗体。

58. 权利要求 54 的方法, 其中所述试剂被可检测标记。

59. 权利要求 54 的方法, 其中所述试剂被选自下组的标记物可检测标记: 放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物、和酶。

60. 诊断患者体内由肿瘤诱导的骨软化的方法, 包括: (1)由所述患者获得肿瘤样品; 并(2)检测所述肿瘤中 FGF23 的表达或缺乏, 其中 FGF23 的表达指示所述患者患有由肿瘤诱导的骨软化。

61. 治疗哺乳动物体内的低血磷紊乱的方法, 包括对患有所述紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的选自下组的成纤维细胞生长因子-23 (FGF23) 抑制剂: 可降低所述哺乳动物体内编码 FGF23 多肽的 mRNA 水平的抑制剂、可降低所述哺乳动物体内 FGF23 多肽水平的抑制剂、和可降低所述哺乳动物体内 FGF23 生物学活性的抑制剂。

62. 权利要求 61 的方法, 其中所述低血磷紊乱选自下组: X 连锁遗传性佝偻病 (XLH)、遗传性低血磷佝偻病 (HHRH)、低血磷骨病 (HBD)、常染色体显性低血磷佝偻病 (ADHR)、由肿瘤诱导的骨软化、表皮痣综合症、纤维性发育不良、和肾结石。

63. 权利要求 61 的方法, 其中所述抑制剂选自下组: 反义核酸、核酶、抗体、肽和肽模拟物。

64. 治疗哺乳动物体内的高血磷紊乱的方法, 包括对患有所述紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的编码成纤维细胞生长因子-23(FGF23) 的分离核酸。

65. 权利要求 64 的方法, 其中所述分离核酸包含赋予其所编码的 FGF23 多肽以升高的稳定性的突变。

66. 权利要求 64 的方法, 其中所述高血磷紊乱选自下组: 轻度肾功能不全和肿瘤性钙沉积。

67. 治疗哺乳动物体内的高血磷紊乱的方法, 包括对患有所述紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的分离成纤维细胞生长因子-23(FGF23)多肽。

68. 权利要求 67 的方法, 其中所述分离 FGF23 多肽包含赋予该多肽以升高的稳定性的突变。

69. 权利要求 67 的方法, 其中所述高血磷紊乱选自下组: 轻度肾功能不全和肿瘤性钙沉积。

70. 治疗哺乳动物体内的高血磷紊乱的方法, 包括对患有所述紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的可升高所述哺乳动物中成纤维细胞生长因子-23(FGF23)水平的试剂。

71. 权利要求 70 的方法, 其中所述试剂可抑制所述 FGF23 多肽的降解。

72. 权利要求 70 的方法, 其中所述高血磷紊乱选自下组: 轻度肾功能不全和肿瘤性钙沉积。

73. 治疗哺乳动物体内的高血磷紊乱的方法, 包括对患有所述紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的细胞群, 所述细胞群中包含编码成纤维细胞生长因子-23(FGF23)的分离核酸。

74. 权利要求 73 的方法, 其中所述分离核酸包含赋予其所编码的 FGF23 多肽的升高的稳定性的突变。

75. 权利要求 73 的方法, 其中所述高血磷紊乱选自下组: 轻度肾功能不全和肿瘤性钙沉积。

76. 治疗哺乳动物体内的骨质疏松症的方法, 包括对所述哺乳动物施用治疗有效量的成纤维细胞生长因子-23(FGF23)或可升高所述哺乳动物体内的 FGF23 多肽水平的试剂。

77. 治疗哺乳动物体内的涉及钙和磷酸盐在动脉或软组织中沉积的状况的方法, 包括对所述哺乳动物施用治疗有效量的成纤维细胞生长因子-23(FGF23)或可升高所述哺乳动物体内的 FGF23 多肽水平的

试剂。

78. 权利要求 77 的方法，其中所述状况是皮炎炎。

79. 治疗哺乳动物体内的冠状动脉疾病的方法，包括对患有该疾病的哺乳动物冠状动脉细胞施用编码成纤维细胞生长因子-23(FGF23)的核酸。

80. 一种诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的试剂盒，该试剂盒包含能够检测编码成纤维细胞生长因子-23(FGF23)多肽的核酸序列中是否存在突变的试剂，其中所述突变的存在指示该哺乳动物患有低血磷紊乱，该试剂盒中还包含用于使用它们的施用器和指导材料。

81. 一种诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的试剂盒，该试剂盒包含能够检测成纤维细胞生长因子-23(FGF23)多肽水平的试剂，其中所述FGF23多肽水平的升高指示该哺乳动物患有低血磷紊乱，该试剂盒中还包含用于使用它们的施用器和指导材料。

82. 一种诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的试剂盒，该试剂盒包含能够检测是否存在突变型成纤维细胞生长因子-23(FGF23)多肽的试剂，其中所述突变型FGF23的存在指示哺乳动物患有低血磷紊乱，该试剂盒中还包含用于使用它们的施用器和指导材料。

83. 权利要求24的分离核酸，其中所述突变选自下组：相对于SEQ ID NO: 1的527G>A, 535C>T和536G>A。

新型成纤维细胞生长因子 (FGF23) 及其使用方法

发明领域

血清磷酸盐水平降低或升高的状况 (分别称为低血磷 (Hypophosphatemia) 和高血磷 (Hyperphosphatemia)) 与多种多样的临床重要疾病有关。通常源自肾磷酸盐流失的低血磷是由许多遗传紊乱引起的, 包括X连锁低血磷佝偻病 (X-linked hypophosphatemic rickets, XLH)、伴随高钙尿的遗传性低血磷佝偻病 (hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria, HHRH)、低血磷骨病 (hypophosphatemic bone disease, HBD)、和常染色体显性低血磷佝偻病 (autosomal dominant hypophosphatemic rickets, ADHR)。在患有轻度肾功能不全和肿瘤性钙沉积的患者中观察到的高血磷常常与软组织钙化、继发性甲状旁腺功能亢进、三发性甲状旁腺功能亢进、和其它代谢紊乱有关。

关于维持正常血清磷酸盐浓度的分子机制了解得很少。对牵涉磷酸盐稳态紊乱的遗传紊乱负有责任的基因的鉴定有可能洞察调控磷酸盐平衡的途径。目前, 尽管低血磷和高血磷状况患者具有明显的临床特征, 然而尚无可用于这些紊乱的早期诊断、分级、和分段的分子标记。同样, 目前对于低血磷和高血磷紊乱患者缺乏有效的治疗方法也提出了对候选疗法的需要。本发明满足了这些需要。

发明概述

本发明包括编码FGF23或其突变体、变体、同系物、或片段的分离核酸。

一方面, 编码FGF23的分离核酸与SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3之至少一项的核酸序列共享至少大约50%的序列同一性。

本发明还包括编码FGF23的分离核酸, 其中所述分离核酸编码的

多肽所具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 4之至少一项的氨基酸序列共享至少40%的序列同一性。

在一个优选的实施方案中，本发明的分离核酸包含在DSMZ保藏号DSM 13530中。

在本发明的一个方面中，编码FGF23的核酸共价连接编码标签多肽的核酸。在一个优选的实施方案中，标签多肽是myc标签多肽、谷胱甘肽-S-转移酶标签多肽、绿色荧光蛋白标签多肽、myc-丙酮酸激酶标签多肽、His6标签多肽、流感病毒血凝素标签多肽、FLAG标签多肽、或麦芽糖结合蛋白标签多肽。

本发明还包括编码FGF23的核酸，其中核酸可操作连接表述启动子/调控序列的核酸。

本发明还包括包含编码FGF23的分离核酸的载体。在一个优选的实施方案中，载体包含可操作连接启动子/调控序列的编码FGF23的分离核酸。

本发明还包括包含编码FGF23的分离核酸或包含所述核酸的载体的重组细胞。

本发明包括与编码FGF23或其突变体、变体、同系物、或片段的核酸互补的分离核酸，其中互补核酸处于反义取向。在一个优选的实施方案中，互补核酸与具有SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3之至少一项的序列的核酸的互补核酸共享至少大约50%的序列同一性。本发明还包括包含反义核酸的载体，以及包含可操作连接表述启动子/调控序列的反义核酸的载体。

本发明还包括包含反义核酸和包含所述核酸的载体的重组细胞。

本发明包括包含编码FGF23或其突变体、变体、同系物、或片段的分离核酸的转基因非人哺乳动物。

本发明还包括包含FGF23或其突变体、变体、同系物、或片段的分离多肽。在一个优选的实施方案中，分离多肽与SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 4之至少一项的氨基酸序列共享至少大约40%的序列同一性。

本发明包括特异结合FGF23多肽或其突变体、变体、同系物、或

片段的抗体。在一个优选的实施方案中，抗体是多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、或合成抗体。

本发明还包括编码FGF23的分离核酸，其中核酸包含突变。在一个优选的实施方案中，突变赋予FGF23以升高的稳定性。更优选的是，突变影响相对于SEQ ID NO: 2的第176位氨基酸（精氨酸）或相对于SEQ ID NO: 2的第179位氨基酸（精氨酸）。甚至更优选的是，突变选自下组：相对于SEQ ID NO: 1的527G>A、535C>T、和536G>A。

本发明还包括包含突变的FGF23多肽。在一个优选的实施方案中，FGF23多肽包含赋予升高的稳定性的突变。更优选的是，突变位于相对于SEQ ID NO: 2的第176位氨基酸（精氨酸）或相对于SEQ ID NO: 2的第179位氨基酸（精氨酸）。

本发明包括FGF23的抑制剂。抑制剂可以是降低编码FGF23多肽的mRNA水平的分子、降低FGF23多肽水平的分子、或降低FGF23生物学活性的分子。在一个优选的实施方案中，抑制剂是反义核酸、核酶、抗体、肽、或肽模拟物。更优选的是，抑制剂是特异结合FGF23的抗体或特异结合FGF23受体的抗体。

本发明包括包含编码FGF23的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

本发明还包括包含与编码FGF23的核酸互补的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

本发明还包括包含分离FGF23多肽和制药学可接受载体的组合物。

本发明还包括包含特异结合FGF23的抗体和制药学可接受载体的组合物。

本发明还包括包含编码突变型FGF23的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

本发明还包括包含编码稳定性升高的突变型FGF23的分离核酸和制药学可接受载体的组合物。

本发明还包括包含编码突变型FGF23的分离核酸和制药学可接受

载体的组合物，所述突变型FGF23在相对于SEQ ID NO: 2的第176位氨基酸（精氨酸）或相对于SEQ ID NO: 2的第179位氨基酸（精氨酸）处包含突变。

本发明还包括包含分离FGF23多肽和制药学可接受载体的组合物，所述FGF23多肽包含突变。

本发明还包括包含分离FGF23多肽和制药学可接受载体的组合物，所述FGF23多肽包含赋予升高的稳定性的突变。

本发明还包括包含分离FGF23多肽和制药学可接受载体的组合物，所述FGF23多肽在相对于SEQ ID NO: 2的第176位氨基酸（精氨酸）或相对于SEQ ID NO: 2的第179位氨基酸（精氨酸）处包含突变。

本发明还包括包含FGF23的抑制剂和制药学可接受载体的组合物。

本发明还包括诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的方法，包括：(1)由所述哺乳动物获得生物学样品；并(2)使所述生物学样品接触能够检测编码FGF23的核酸中是否存在突变的试剂，其中突变的存在指示哺乳动物患有低血磷紊乱，由此诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱。

在一个优选的实施方案中，低血磷紊乱是常染色体显性低血磷佝偻病（ADHR）。

在另一个优选的实施方案中，生物学样品是血液或尿液。

在还有一个优选的实施方案中，试剂是核酸。更优选的是，试剂被可检测标记。优选的标记物包括放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物、和酶。

本发明还包括诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的方法，包括：(1)由所述哺乳动物获得生物学样品；并(2)使所述生物学样品接触能够检测是否存在突变型FGF23多肽的试剂，其中所述突变型FGF23多肽的存在指示哺乳动物患有低血磷紊乱，由此诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱。

在一个优选的实施方案中，低血磷紊乱是常染色体显性低血磷佝偻病（ADHR）。

在另一个优选的实施方案中，生物学样品是血液或尿液。

在还有一个优选的实施方案中，试剂是抗体。

本发明还包括诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的方法，包括：(1)由所述哺乳动物获得生物学样品；并(2)使所述生物学样品接触能够检测样品中FGF23多肽水平的试剂，其中样品中FGF23多肽水平相对于对照哺乳动物中FGF23多肽水平的升高指示哺乳动物患有低血磷紊乱，由此诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱。

在一个优选的实施方案中，低血磷紊乱选自下组：X连锁遗传性佝偻病(XLH)、遗传性低血磷佝偻病(HHRH)、低血磷骨病(HBD)、常染色体显性低血磷佝偻病(ADHR)、由肿瘤诱导的骨软化、表皮痣综合症、纤维性发育不良、和肾结石。

在另一个优选的实施方案中，生物学样品是血液或尿液。

在还有一个优选的实施方案中，试剂是FGF23抗体。更优选的是，试剂经过可检测标记。优选的标记物包括放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物、和酶。

本发明还包括诊断患者体内由肿瘤诱导的骨软化的方法，包括：(1)由所述患者获得肿瘤样品；并(2)检测肿瘤中FGF23的表达或缺乏，其中FGF23的表达指示患者患有由肿瘤诱导的骨软化。

本发明还包括治疗哺乳动物体内的低血磷紊乱的方法，包括对患有该紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的FGF23抑制剂。抑制剂可以是降低所述哺乳动物体内编码FGF23多肽的mRNA水平的抑制剂、降低所述哺乳动物体内FGF23多肽水平的抑制剂、或降低所述哺乳动物体内FGF23生物学活性的抑制剂。

在一个优选的实施方案中，低血磷紊乱选自下组：X连锁遗传性佝偻病(XLH)、遗传性低血磷佝偻病(HHRH)、低血磷骨病(HBD)、常染色体显性低血磷佝偻病(ADHR)、由肿瘤诱导的骨软化、表皮痣综合症、纤维性发育不良、和肾结石。

在另一个优选的实施方案中，抑制剂是反义核酸、核酶、抗体、肽、或肽模拟物。

本发明还包括治疗哺乳动物体内的高血磷紊乱的方法，包括对患有该紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的编码FGF23的分离核酸。

在一个优选的实施方案中，分离核酸包含赋予其所编码的FGF23多肽以升高的稳定性的突变。

在另一个优选的实施方案中，高血磷紊乱是轻度肾功能不全或肿瘤性钙沉积。

本发明还包括治疗哺乳动物体内的高血磷紊乱的方法，包括对患有该紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的分离FGF23多肽。

在一个优选的实施方案中，分离FGF23多肽包含赋予升高的稳定性的突变。

在另一个优选的实施方案中，高血磷紊乱是轻度肾功能不全或肿瘤性钙沉积。

本发明还包括治疗哺乳动物体内的高血磷紊乱的方法，包括对患有该紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的试剂，所述试剂能够升高哺乳动物体内的FGF23多肽水平。

在一个优选的实施方案中，试剂可抑制FGF23多肽的降解。

在另一个优选的实施方案中，高血磷紊乱是轻度肾功能不全或肿瘤性钙沉积。

本发明还包括治疗哺乳动物体内的高血磷紊乱的方法，包括对患有紊乱的哺乳动物施用治疗有效量的细胞群体，所述细胞群体包含编码FGF23的分离核酸。

在一个优选的实施方案中，分离核酸包含赋予其所编码的FGF23多肽以升高的稳定性的突变。

在另一个优选的实施方案中，高血磷紊乱是轻度肾功能不全或肿瘤性钙沉积。

本发明还包括治疗哺乳动物体内的骨质疏松的方法，包括对哺乳动物施用治疗有效量的FGF23或能够升高哺乳动物体内的FGF23多肽水平的试剂。

本发明还包括治疗哺乳动物体内牵涉钙和磷酸盐在动脉或软组织

中沉积的状况，包括对哺乳动物施用治疗有效量的FGF23或能够升高FGF23多肽水平的试剂。

在一个优选的实施方案中，该状况是皮炎。

本发明还包括治疗哺乳动物体内的冠状动脉疾病的方法，包括对患病哺乳动物的冠状动脉细胞施用编码FGF23的核酸。

本发明还涉及诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的试剂盒。试剂盒包含能够检测编码FGF23的核酸序列中是否存在突变的试剂，其中突变的存在指示哺乳动物患有低血磷紊乱。试剂盒还包含用于使用它们的施用器和指导材料。

本发明还包括诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的试剂盒。试剂盒包含能够检测FGF23多肽水平的试剂，其中FGF23多肽水平的升高指示哺乳动物患有低血磷紊乱。试剂盒还包含用于使用它们的施用器和指导材料。

本发明还包括诊断哺乳动物体内的低血磷紊乱的试剂盒。试剂盒包含能够检测是否存在突变型FGF23多肽的试剂，其中突变型FGF23的存在指示哺乳动物患有低血磷紊乱。试剂盒还包含用于使用它们的施用器和指导材料。

图的简述

结合附图进行阅读将能够更好的理解上文概述及下文本发明优选实施方案的详述。出于例示本发明的目的，图中显示了目前优选的实施方案。然而，应当理解，本发明不限于所示明确安排和手段。

在附图中：

图1A是描绘两个不同ADHR家族（1406和1478）的家谱内连锁分析的示意图。

图1B是描绘三个不同ADHR家族（1406、1478、和2318）的突变分析的一系列家谱示意图和琼脂糖凝胶图像。

图2是描绘ADHR区域的物理图谱的示意图。根据尚未完成的序列数据（贝勒医学院人类基因组测序中心）的估计，按比例绘制了DNA

标记和BAC/PAC的位置。箭头指示克隆RP11-303E5与RP11-320N7、克隆RP11-103A11与RP11-935C2之间的基因组序列中的缺口。指示了D12S1624与D12S1594之间的基因、GPR64、和GDF2的大致位置。

图3A-3C是FGF23与其它哺乳动物FGF家族成员的氨基酸序列比对 (SEQ ID NO: 14-34即它们在图中出现的顺序)。比对限于由十二条反向平行 β 链组成的核心序列。下划线指示FGF2晶体结构中具有 β -折叠构象的区段的位置。在FGF23中突变的两个精氨酸 (图3C; 以星号指示) 在FGF23的小鼠同系物中是保守的。比对是用CLUSTAL和PRETTYBOX产生的。人和小鼠FGF23是由PFAM数据库的FGF文件鉴定的 ($4.6e-14$ 、 $1.9e-16$)。它们与FGF家族的其它成员在共有核心序列中共享25% - 36%的氨基酸同一性。

图4A是描绘FGF23的组织表达的琼脂糖凝胶图像。使用跨内含子引物对来自人组织的RNA进行的RT-PCR分析在人心 (H)、肝 (L)、甲状腺/甲状旁腺 (TP)、小肠 (SI)、睾丸 (T)、和骨骼肌 (SM) 中揭示了650bp产物, 而脑 (B) 和肾 (K) 呈阴性。

图4B是描绘暴露7天后多种癌细胞系中的FGF23表达的Northern印迹图像。在严谨清洗条件下在慢性骨髓性白血病细胞系K562中观察到3kb和1.3kb转录本 (泳道3)。其它细胞系生成3kb或1.3kb转录本。(泳道1 = HL-60; 泳道2 = HeLaS3; 泳道4 = MOLT-4; 泳道5 = RAJI; 泳道6 = SW480; 泳道7 = A549; 泳道8 = G-361。)

图5A是人FGF23的cDNA序列 (SEQ ID NO: 1)。

图5B是人FGF23的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)。

图6A是小鼠FGF23的cDNA序列 (SEQ ID NO: 3)。

图6B是小鼠FGF23的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4)。

图7A是描绘由细菌生成的FGF23的体外表达的Western印迹图像。抗FGF23抗体识别来自经IPTG诱导 (+) 而非未经诱导 (-) 的细菌的27kDa蛋白质, 所述细菌被标记了组氨酸的FGF23 (FGF23-6xHis) 转化。

图7B是描绘转染细胞的FGF23表达的Northern印迹图像。使用

FGF23探针对来自经FGF23表达载体转染的HEK293细胞的总RNA (pFGF23; 泳道3)的Northern印迹分析揭示了1.1kb单一转录本。(泳道1 = 未转染的HEK293细胞; 泳道2 = 经对照载体pcDNA3.1转染的HEK293细胞。)

图7C是描绘转染细胞的FGF23分泌的Western印迹图像。在由经pFGF23转染的细胞(泳道2、4、6)而非未转染细胞(泳道1、3、5)获得的浓缩后条件培养基中,抗FGF23抗体识别32kDa和12kDa的两条蛋白质条带。

图8A是描绘致癌低血磷骨软化(OHO)肿瘤中的FGF23表达的Northern印迹图像。来自五种不同OHO肿瘤(泳道3-7)的总RNA的Northern印迹分析展示了曝光30分钟后1.3kb和3kb的强杂交FGF23转录本和弱2kb条带,而对照组织呈阴性。(泳道1 = 人肝; 泳道2 = 人甲状旁腺; 泳道8 = 小鼠脑; 泳道9 = 小鼠心; 泳道10 = 小鼠肾。)

图8B是描绘OHO肿瘤样品中的FGF23蛋白质表达的Western印迹图像。对来自OHO肿瘤的2 μ g提取物的分析证明了使用抗FGF23抗体(+)而非免疫前血清(-)检测到32kDa蛋白质。

图9是人FGF23的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2),其中指示了预测的信号肽和RXXR/S蛋白酶切割位点。

图10A是描绘野生型和ADHR突变型FGF23蛋白质的表达和分泌的一系列Western印迹图像。使用抗FGF23抗体对由经表达野生型(FGF23)或ADHR突变型(R176Q、R179W、R179Q) FGF23的质粒转染的HEK293细胞获得的2 μ g条件培养基(M)或50 μ g细胞裂解物(L)进行Western印迹分析。在野生型FGF23的条件培养基中检测到32kDa和12kDa条带,而只在ADHR突变型中检测到32kDa条带。所有经FGF23转染的细胞裂解物都呈阴性,而且所有构建物展示相似的转染效率。

图10B是野生型和ADHR突变型(R176Q、R179W、R179Q)人FGF23的第172-184位氨基酸的列表。

图11A是描绘FLAG标记FGF23的表达的Western印迹图像。使用

FLAG特异性单克隆抗体(M2)进行的Western印迹分析用于检测由经表达野生型或R176Q突变型FGF23的质粒转染的HEK293细胞获得的条件培养基中的N末端FLAG标记野生型(两个不同克隆,左边的两条泳道)或R176Q(两个不同克隆,右边的两条泳道)FGF23。野生型FLAG-FGF23被检测为36kDa条带和显著的26kDa片段,而FLAG-R176Q突变型主要分辨为36kDa条带,并有一26kDa的弱带。

图11B是描绘FGF23蛋白质的示意图,其中显示了FLAG表位、抗FGF23表位、和SPC位点的相对位置。

图12A是描绘胞外暴露FGF23蛋白质于HEK293细胞的Western印迹图像。使用FGF23特异抗体对与 5×10^6 个HEK293细胞一起(+)或在空培养皿中(-)保温24小时的FGF23条件培养基进行Western印迹分析。处理后32kDa和12kDa条带的强度没有差异。

图12B是考马斯蓝染色凝胶的图像。将图12A中所示样品平行电泳,考马斯染色确认了凝胶上样量相等。

图13是描绘野生型和ADHR突变型FGF23结合肝素的Western印迹图像。将由野生型或突变型FGF23及FLAG标记野生型或突变型FGF23转染的HEK293细胞获得的条件培养基与肝素-sepharose一起保温,并使用抗FGF23抗体对结合的物质进行Western印迹分析。32kDa条带对应于结合肝素的野生型或突变型FGF23。在对照载体的情况下,培养基呈阴性。不知道有些样品中大约28kDa弱带的来源。(泳道1=天然FGF23;泳道2=R176Q;泳道3=R179W;泳道4=R179Q;泳道5=CMV载体;泳道6=FLAG-FGF23;泳道7=FLAG-176Q;泳道8=FLAG载体。)

发明详述

本发明涉及编码哺乳动物成纤维细胞生长因子-23(FGF23)的新型核酸及由其编码的蛋白质的发现。本发明公开了成纤维细胞生长因子家族的新成员,其中该核酸及由其编码的蛋白质可用于开发用于诊断和治疗低血磷和高血磷紊乱的诊断性和治疗性试剂。

肾在维持正常血清磷酸盐浓度中发挥主要作用。引起少见的磷酸盐调控受损的可遗传紊乱的基因的鉴定为找到控制无机离子平衡的肾途径提供了机会。

在本文公开的初步实验中，发现了对常染色体显性低血磷佝偻病（ADHR）负有责任的基因，并命名为FGF23。ADHR的特征是身材矮小、骨骼疼痛、骨折、和下肢畸形。本文还发现了FGF23在导致致瘤低血磷骨软化（肾磷酸盐流失的获得性紊乱）的肿瘤中过度表达。患有致瘤低血磷骨软化的患者与ADHR患者具有生化和临床相似性。这些只是可以通过降低患者体内的FGF23水平和/或活性来治疗的数种低血磷疾病中的两种。对FGF23抑制剂治疗敏感的其它低血磷疾病包括但不限于XLH、HHRH、HBD、表皮痣综合症、纤维性发育不良、肾结石、等等。

与特征为肾磷酸盐流失和低血清磷酸盐的低血磷疾病不同，高血磷疾病（包括轻度肾功能不全、肿瘤性钙沉积、等等）的特征是血清中磷酸盐过度。施用FGF23能够刺激尿液中的磷酸盐排泄，从而降低血清中的磷酸盐水平。因此，可以通过施用天然FGF23或能够升高患者体内FGF23多肽水平的分子来治疗高血磷疾病。另外，突变型FGF23还可用于治疗高磷血症，特别是在突变体具有比天然FGF23更长的半衰期的情况中。本文公开了具有较长半衰期的特定FGF23突变体。

因此，在本发明中还发现FGF23可能涉及动物体内的低血磷和高血磷两种状况。从本质上说，当动物体内的FGF23水平异常升高时（通常是蛋白质过度表达或因遗传突变而活性升高），动物因磷酸盐流失升高而表现低血磷。尽管尚未确定异常FGF23水平是否在高血磷中发挥致病作用，然而FGF23在动物体内降低血清磷酸盐水平的能力清楚指示FGF23在调控磷酸盐稳态中发挥重要作用。

本发明包括编码FGF23的分离核酸。正如本文中公开的，由人细胞和鼠细胞分离得到了编码FGF23的分离核酸（分别参阅例如图5A和6A；SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3）。编码FGF23的优选核酸是DNA。另外，尽管本文例示了人和鼠FGF23核酸和蛋白质，然而不应解释为

本发明只限于由这些哺乳动物物种获得的FGF23，而是应当解释为本发明包括编码具有本文定义的FGF23生物学活性的FGF23或其任何突变体、变体、或同系物的任何分离核酸。优选的是，编码本发明FGF23的DNA与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3共享大约50%的同源性。更优选的是，该DNA与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3共享大约60%、甚至更优选大约70%、仍然更优选大约80%、更优选90%、仍然更优选95%、且甚至更优选大约99-100%同源性。

本发明包括编码FGF23的核酸，其中编码标签多肽的核酸与其共价连接。即本发明涵盖嵌合核酸，其中编码标签多肽的核酸序列与编码FGF23多肽的核酸共价连接。这些标签多肽在本领域是众所周知的，包括例如绿色荧光蛋白（GFP）、myc、myc-丙酮酸激酶（myc-PK）、His6、麦芽糖结合蛋白（MBP）、流感病毒血凝素标签蛋白、FLAG标签多肽（FLAG）、和谷胱甘肽-S-转移酶（GST）标签多肽。然而，绝不能解释为本发明限于编码上述标签多肽的核酸，而是应当解释为本发明包括编码能够以与这些标签多肽基本上相似的方式发挥功能的多肽的任何核酸序列。

包含编码标签多肽的核酸的核酸可用于在细胞、组织、和/或完整生物体（如哺乳动物胚胎）中定位FGF23、检测由细胞分泌的FGF23、和研究FGF23在细胞中的作用。另外，添加标签多肽便于分离和纯化被“标记”蛋白质，从而能够容易的生成和纯化本发明的蛋白质。

本发明还包括编码FGF23的核酸，其中表述启动子/调控序列的核酸与其可操作连接。优选的是，表述启动子/调控序列的核酸位于FGF23编码序列的5'端，从而驱动所需蛋白质在细胞中的表达。

在其它相关方面中，本发明包括包含编码FGF23的分离核酸的载体。优选的是，该载体能够在包含载体的细胞中指导FGF23的表达。适用于本发明的载体包括但不限于便于在原核或真核细胞或二者中生成多拷贝的FGF23编码核酸或便于表达FGF23蛋白质的载体。因此，不应解释为本发明限于任何已知载体系统，而是应当包括所有已知的或至今未知的便于在细胞中生成多拷贝的FGF23编码核酸或便于表达

FGF23蛋白质的合适载体。合适载体的范例包括用于在细菌中复制和表达的基于噬菌体T7的表达载体、用于在哺乳动物细胞中复制和表达的pMSXND表达载体、和用于在昆虫细胞中复制和表达的由杆状病毒衍生的载体。本发明还涵盖腺病毒、逆转录病毒、和其它病毒载体。

优选的是，本发明的分离核酸分子在本发明的重组载体中可操作连接启动子/调控元件和其它调控元件，诸如终止信号、聚腺苷酸化信号、等等，每一种都保证FGF23在细胞中的有效复制和表达。不应解释为本发明限于驱动FGF23表达的任何特定启动子/调控序列，而是应当解释为本发明包括能够可操作连接FGF23编码核酸并由此在任何期望的真核或原核细胞中实现FGF23表达的任何和所有合适启动子/调控序列。用于将合适启动子序列连接核酸的技术在本领域是众所周知的，而且描述于例如Sambrook等人，1989，《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即《分子克隆：实验室手册》，冷泉港实验室，纽约；Ausubel等人，1997，《Current Protocols in Molecular Biology》即《分子生物学通用方案》，John Wiley & Sons，纽约；和Gerhardt等人编，1994，《Methods for General and Molecular Bacteriology》即《普通和分子细菌学方法》，美国微生物学学会，华盛顿特区。

本发明还包括包含本发明载体的细胞，其中细胞是原核或真核细胞，即例如哺乳动物、细菌、昆虫、或酵母细胞。正如本文所述，可以使用这些包含载体的细胞来生成FGF23蛋白质。同样，不应解释为本发明限于用于表达FGF23的特定细胞类型。

本发明还包括具有相对于编码FGF23的分离核酸的整个或部分处于反义取向的序列的分离核酸。一方面，本发明包括特征为能够结合编码FGF23的mRNA从而抑制FGF23合成的反义RNA序列。同样，本发明关注包含反义FGF23分离核酸序列的载体（包括那些其中所含核酸可操作连接启动子/调控元件的载体）和细胞。

另一方面，本发明包括包含与编码FGF23的mRNA互补的RNA序列的核酶，其中核酶由此能够结合并切割该mRNA，从而抑制由mRNA编码的FGF23的合成。核酶由能够在分子间切割靶RNA例如FGF23

mRNA的单链RNA构成。遵循本领域所述流程，有可能构建能够在特定靶位点切割RNA的核酶（如Tanner等人，《Antisense Research and Applications》即《反义研究和应用》，CRC出版社，1993，第415-426页）。对于这些核酶的两个主要必要条件是催化结构域和与靶RNA互补使其能够结合底物（切割的前提）的区域。反义RNA和核酶可用作FGF23表达的抑制剂。优选的是，本发明的反义RNA和核酶与编码FGF23的mRNA的5'端互补。根据本文提供的序列，反义片段和核酶生成领域的技术人员将知道能够通过反义分子或核酶精确靶向哪些FGF23 mRNA序列从而实现对FGF23表达的抑制。

有两种类型的核酶，即四膜虫型(tetrahymena-type) (Hasselhoff, 1988, Nature, 334: 585) 和锤头型。四膜虫型核酶识别长度为四个碱基的序列，而锤头型核酶识别长度为11-18个碱基的序列。序列越长，序列专一存在于靶mRNA分子中的可能性越大。因此，对于灭活特定mRNA分子，优选锤头型核酶而非四膜虫型核酶，而且优选18个碱基的识别序列而非较短的识别序列，后者可能随机存在于各种无关mRNA分子中。

可以通过将靶序列掺入核酶基础结构来设计可用于抑制FGF23表达的核酶，所述核酶基础结构与由FGF23编码的FGF23 mRNA序列互补，或者与SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3之至少一项具有至少大约50%的序列同一性。可以使用商品化试剂来合成靶向FGF23的核酶（Applied Biosystems公司，福斯特城，加州），或者可以由编码它们的DNA进行遗传表达。

本发明还包括转基因非人哺乳动物，它的基因组缺乏功能性FGF23，因而消除了FGF23的生物学活性。在一个范例中，转基因非人哺乳动物包含插入其基因组中的期望位点的外源核酸，从而删除FGF23编码区，即敲除转基因哺乳动物。这些动物提供了研究与FGF23突变有关的人类疾病状况的有用模型。优选的是，转基因哺乳动物是小鼠。其中FGF23功能遭到敲除的小鼠将具有高血磷表型或非磷酸盐表型。

另外，本发明包括转基因非人哺乳动物，其中编码FGF23的外源核酸插入基因组位点，即“敲入”转基因哺乳动物。插入的敲入转基因可以包含与编码FGF23的核酸可操作连接的编码例如标签多肽、启动子/调控区的多种核酸，它们通常不存在于细胞中或者通常不与FGF23可操作连接。FGF23敲入转基因的表达有可能在哺乳动物中引起低血磷，导致与致癌性低血磷骨软化和ADHR类似的表型。野生型和突变型FGF23都可插入哺乳动物基因组。具体而言，本文公开的突变体的插入将生成FGF23的更稳定形式，因此可能在动物中导致持久的或增强的低血磷状况。

优选使用现在描述的方法来实现本发明转基因非人哺乳动物的生成。然而，绝不能解释为本发明只限于这种方法的使用，而是可以使用其它方法来生成所需敲除哺乳动物。

在生成转基因非人哺乳动物的优选方法中，基本上如Nagy和Rossant (1993, 《Gene Targeting, A Practical Approach》即《基因靶向，实践方法》，第146-179页，Joyner编，IRL出版社)中所述，生成包含本发明转基因的ES细胞，然后将该细胞用于生成敲除哺乳动物。若通过注射到宿主胚胎中或与卵裂球阶段的胚胎聚集而使ES细胞返回到胚胎环境中，则它们的表现像正常胚胎细胞。在如此返回后，细胞具有沿着所有胚胎谱系发育的全部潜能。因此，有可能获得ES细胞，在其中导入期望DNA，然后使细胞返回到胚胎环境使之发育成成熟的哺乳动物细胞，其中目的DNA有可能被表达。

用于生成转基因小鼠的精确方案公开于Nagy和Rossant, 1993, 《Gene Targeting, A Practical Approach》即《基因靶向，实践方法》，第146-179页，Joyner编，IRL出版社，因此本文不再重复。使用标准方案来实现转染或转导ES细胞从而导入期望DNA，诸如Sambrook等人, 1989, 《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即《分子克隆：实验室手册》，冷泉港实验室，纽约；和Ausubel等人, 1997, 《Current Protocols in Molecular Biology》即《分子生物学通用方案》，John Wiley & Sons, 纽约中所述。优选的是，如Soriano等人 (1991, Cell, 64:

693-702)所述,将本发明转基因中所包含的期望DNA电穿孔到ES细胞中并增殖细胞。

通过转基因技术的任何标准技术来实现将分离核酸导入哺乳动物受精卵(Hogan等人,1986,《Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual》即《小鼠胚胎操作:实验室手册》,冷泉港,纽约)。最常用的是,通过显微注射将核酸导入胚胎。

一旦将核酸导入卵,例如Hogan等人(1986,《Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual》即《小鼠胚胎操作:实验室手册》,冷泉港,纽约)所述,即将卵短期保温,然后转移到与卵源相同物种的假孕哺乳动物中。通常,每个实验注射许多卵,而大约三分之二的卵在流程中存活。然后将大约二十个存活卵转移到假孕动物中,通常四-十个如此转移的存活卵将发育成活的幼畜。

任何哺乳动物FGF23基因都可用于本文描述的方法,以生成包含转基因的转基因哺乳动物或转基因细胞,所述转基因包含FGF23基因的整个或部分删除。优选的是,使用诸如小鼠FGF23(SEQ ID NO: 3)等FGF23基因,也可以使用人FGF23(SEQ ID NO: 1)基因。

本发明的转基因哺乳动物可以是任何哺乳动物物种。因此,应当解释为本发明包括编码嵌合核酸的转基因哺乳动物的生成,所述哺乳动物包括小鼠、仓鼠、大鼠、兔、猪、绵羊、和牛。可以使用任何哺乳动物物种而类似的应用本文描述的用于生成转基因小鼠的方法。优选的是,本发明的转基因哺乳动物是啮齿类,甚至更优选的是,本发明的转基因哺乳动物是小鼠。作为范例,Lukkarinen等人(1997, Stroke, 28: 639-645)传授了能够生成转基因小鼠的基因构建物也能够生成其它转基因啮齿类,包括大鼠。类似的,一种动物物种基因座中的零合突变能够在与前一物种具有高度同源基因座的另一物种动物中复制。

为了鉴定本发明的转基因哺乳动物,使用标准技术诸如Southern印迹杂交、PCR、和/或RT-PCR对幼畜检查分离核酸的存在。还使用本文描述的常用技术来评估核酸在哺乳动物细胞和组织中的表达。另

外,可以如本文公开的(如Western印迹分析)或使用本领域众所周知的用于检测蛋白质的标准方法来测定FGF23在转基因动物循环血中的存在与否。

由本发明转基因哺乳动物获得的细胞(也认为是本文中所用使用术语“转基因细胞”)涵盖诸如那些由本文其它部分所述FGF23(+/-)和(-/-)转基因非人哺乳动物获得的细胞,是可用于模拟被认为与FGF23表达水平改变有关的哺乳动物疾病和症状的有用系统。

特别合适的是由本文所述敲除或敲入转基因非人哺乳动物的组织衍生的细胞,其中包含FGF23基因的转基因在多种组织中得到表达或抑制FGF23表达。作为范例,衍生这些细胞的细胞类型包括(1)FGF23(+/+),(+/-)、和(-/-)转基因活产非人哺乳动物;(2)FGF23(+/+),(+/-)、或(-/-)哺乳动物胚胎;和(3)由FGF23(+/+),(+/-)、和(-/-)胎儿和活产哺乳动物获得的胎盘细胞系的成纤维细胞和内皮细胞。

本发明还包括由FGF23核酸编码的分离多肽。由人和小鼠FGF23 DNA编码的氨基酸序列分别提供于本文图5B和6B及SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 4。如上所述,绝不能解释为本发明限于由人和鼠物种分离得到的FGF23,而是,应当解释为本发明包括具有本文定义的FGF23生物学活性的任何分离FGF23多肽或其突变体、变体、或同系物。

虽然人和小鼠FGF23蛋白质的优选氨基酸序列分别是SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 4,但是不应解释为本发明限于这些序列。而是,应当解释为人和小鼠FGF23的氨基酸序列包括具有本文定义的FGF23生物学活性的任何突变体、变体、或同系物。优选的是,FGF23的氨基酸序列与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4共享大约40%的序列同一性。更优选的是,氨基酸序列与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4共享大约50%、甚至更优选大约60%、仍然更优选大约70%、更优选大约80%、甚至更优选大约90%、仍然更优选95%、甚至更优选大约99-100%的同源性。

本发明还提供了由FGF23基因编码的蛋白质或肽的类似物。正如本文的定义,类似物可以因保守氨基酸序列差异或不影响序列的修饰

或二者而与天然存在的蛋白质或肽不同。

除了全长肽，本发明还提供了具有本文定义的FGF23生物学活性的肽。根据本文公开的序列，本领域技术人员将领会，可以使用标准重组技术来生成FGF23交叠片段，例如Sambrook等人，1989，

《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即《分子克隆：实验室手册》，冷泉港实验室出版社，纽约；和Ausubel等人，1997，《Current Protocols in Molecular Biology》即《分子生物学通用方案》，John Wiley & Sons，纽约中所述。根据本文展示的公开书，本领域技术人员将领会，可以通过将FGF23片段注入小鼠并评估注射后小鼠是否展示磷酸盐流失来测试FGF23片段的生物学活性。磷酸盐流失的诱导将作为FGF23片段保留生物学活性的指示。另外，可用体外实验测试FGF23生物学活性。例如，可以用FGF23片段灌注分离肾小管，并评估相对于野生型FGF23的磷酸盐转运的改变。类似的，可以用FGF23片段转染拥有必需FGF23信号转导机制（即FGF受体和钠转运蛋白）的细胞培养物模型，随后测试相对于野生型FGF23的磷酸盐转运的改变。

如上所述，本发明还提供了由FGF23编码的蛋白质或肽的类似物。类似物可以因保守氨基酸序列差异或不影响序列的修饰或二者而与天然存在的蛋白质或肽不同。使用本领域众所周知的重组DNA技术，诸如Sambrook等人，1989，《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即《分子克隆：实验室手册》，冷泉港实验室出版社，纽约；和Ausubel等人，1997，《Current Protocols in Molecular Biology》即《分子生物学通用方案》，John Wiley & Sons，纽约中所述，任何流程都可用于生成FGF23的突变体、衍生物、或变体形式。

例如，可以进行保守氨基酸变化，尽管它们改变了蛋白质或肽的一级序列，然而通常不改变其功能。保守氨基酸替代通常包括下列各组内的替代：

甘氨酸、丙氨酸；

缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；

天冬氨酸、谷氨酸；

天冬酰胺、谷氨酰胺；
丝氨酸、苏氨酸；
赖氨酸、精氨酸（除了蛋白水解酶识别位点以外的位置）；
苯丙氨酸、酪氨酸。

修饰（通常不改变一级序列）包括多肽的体内或体外化学衍生化，如乙酰化或羧化。还包括糖基化修饰，如在其合成和加工过程中或者在进一步加工步骤中改变多肽的糖基化模式产生的修饰；如将多肽暴露于影响糖基化的酶，如哺乳动物糖基化或去糖基化酶。还涵盖具有磷酸化氨基酸残基例如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸、或磷酸苏氨酸的序列。

还包括已经使用常用分子生物学技术进行了修饰的多肽，从而改进了它们对蛋白水解降解的抗性，或优化了溶解特性，或使得它们更适合作为治疗剂。这些多肽的类似物包括那些包含除了天然存在的L-氨基酸以外的残基如D-氨基酸或非天然存在的合成氨基酸的多肽类似物。本发明的肽不限于本文所列任何特定例示方法的产物。

术语“FGF23的生物学活性”在用于本文时指在体内或在体外分子结合FGF受体并改变磷酸盐转运的能力。根据本公开书，熟练技术人员将领会，本发明不限于评估FGF23活性的任何具体方法，而且本发明涵盖本领域已知的或未来将开发的评估FGF23活性的任何测定法。

本发明不仅提供了分离的FGF23蛋白质、肽、及其类似物和片段，而且还提供了它们的生成方法。在本发明的一个方面中，通过在允许合成该蛋白质的条件下培养包含载体的细胞来生成FGF23蛋白质、肽、及其类似物和片段，其中所述载体包含FGF23核酸。可以通过常规手段包括层析、亲和、和基于免疫学的分离（如使用抗FGF23抗体）来进行重组生成的FGF23蛋白质、多肽、片段、等的分离和纯化。这每一种方法都描述于标准教科书，诸如Sambrook等人，1989，《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即《分子克隆：实验室手册》，冷泉港实验室，纽约；Ausubel等人，1997，《Current Protocols in Molecular

Biology》即《分子生物学通用方案》，John Wiley & Sons, 纽约；和 Gerhardt 等人编，1994，《Methods for General and Molecular Bacteriology》即《普通和分子细菌学方法》，美国微生物学学会，华盛顿特区。

本发明还包括可特异结合FGF23的抗体或其片段。在一个优选的实施方案中，本发明包括可抑制FGF23的生物学活性的抗体。该抗体可用于在诊断性测定法中鉴定FGF23，用于在患有与FGF23水平有关的疾病的哺乳动物中测定FGF23水平。另外，正如本文所述，特异结合FGF23的抗体可用于阻断FGF23与其相关受体之间的相互作用，因而可用于在FGF23相关疾病治疗的治疗状况中。

已经鉴定了FGF23的两种受体，包括FGFR2和FGFR4；然而，没有理由相信这些是唯一的两种FGF23受体。为了鉴定其它FGF受体，可以采用下列测定法。可以使用标准蛋白质结合测定法来检测FGF23与其受体的结合，包括使用固定化的蛋白质A来沉淀商品化FGF受体-Fc嵌合物。另外，可以通过本领域的标准方法来筛选表达文库，从而检测FGF23与除那些已知结合FGF的受体以外的受体的结合。因此，通过本文提供的下列实验，可以鉴定其它FGF23受体。

通过本文描述的遗传或非遗传手段，对患者施用FGFR2和FGFR4或其它FGF23受体，可以抑制FGF23的相互作用及随后的激活，从而治疗低血磷。同样，阻断FGF23与其受体相互作用的抗体和其它小分子可以通过结合FGF23或其受体来发挥抑制FGF23活性的功能。根据本文呈现的公开书，本领域技术人员将领会，可以使用许多较好表征的蛋白质结合测定法之一通过对化合物筛选它们阻断FGF23与其受体相互作用的能力来鉴定FGF23受体阻断剂。

可特异结合FGF23的抗体的生成描述于本文的实验详述部分。然而，不应解释为本发明只限于那些本文具体公开的抗体，而是应当包括能够生成的特异结合FGF23的任何和所有抗体。例如，通过给期望动物接种抗原并由其分离特异结合该抗原的抗体来实现多克隆抗体的生成。

可以使用任何众所周知的单克隆抗体制备流程来制备针对蛋白质或肽的全长或肽片段的单克隆抗体，诸如Harlow等人，1988，《Antibodies: A Laboratory Manual》即《抗体：实验室手册》，冷泉港，纽约；和Tuszynski等人，1988，Blood，72：109-115中所述。还可以使用化学合成技术来合成多种期望肽。或者，可以克隆编码期望肽的DNA，并在适用于生成大量肽的细胞中由适当的启动子序列进行表达。使用本文提及的标准流程，由经肽免疫的小鼠生成针对该肽的单克隆抗体。

可以使用本领域可用技术对使用本文所述流程获得的单克隆抗体的编码核酸进行克隆和测序，所述技术描述于例如Wright等人，1992，Critical Rev. in Immunol.，12(3,4)：125-168及其引用的参考文献。另外，可以使用Wright等人，同上，及其引用的参考文献；和Gu等人，1997，Thrombosis and Hematocyst，77(4)：755-759中描述的技术将本发明的抗体“人源化”。

为了生成噬菌体抗体文库，首先由分离自细胞如杂交瘤的mRNA获得cDNA文库，所述细胞表达期望表达在噬菌体表面的目的蛋白质，如期望抗体。使用逆转录酶生成mRNA的cDNA拷贝。通过PCR获得编码免疫球蛋白片段的cDNA，并将得到的DNA克隆到合适的噬菌体载体中以生成包含编码免疫球蛋白基因的DNA的噬菌体DNA文库。用于生成包含异源DNA的噬菌体文库的流程在本领域是众所周知的，描述于例如Sambrook等人，1989，《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即《分子克隆：实验室手册》，冷泉港实验室，纽约。

可以改造编码期望抗体的噬菌体，使得蛋白质展示在其表面，从而能够结合其相应结合蛋白，如抗体所针对的抗原。因此，在将表达特定抗体的噬菌体与表达相应抗原的细胞一起保温时，噬菌体将结合细胞。不表达抗体的噬菌体将不结合细胞。这种淘选技术在本领域是众所周知，描述于例如Wright等人，同上。

已经开发了使用M13噬菌体展示来生成抗体的流程，诸如上文所述（Burton等人，1994，Adv. Immunol.，57：191-280）。本质上，

由得自抗体生成细胞群体的mRNA生成cDNA文库。mRNA编码重排后的免疫球蛋白基因，因此cDNA编码相同基因。将扩增后的cDNA克隆到M13表达载体中，生成在其表面表达人Fab片段的噬菌体文库。通过抗原结合选择展示目的抗体的噬菌体，并在细菌中繁殖以生成可溶性人Fab免疫球蛋白。因此，与常规单克隆抗体合成相反，该流程使编码人免疫球蛋白的DNA永生代，而非表达人免疫球蛋白的细胞。

刚才展示的流程描述了编码抗体分子Fab片段的噬菌体的生成。然而，不应解释为本发明只限于编码Fab抗体的噬菌体的生成。而是，本发明还包括编码单链抗体（scFv/噬菌体抗体库）的噬菌体。Fab分子包含完整的Ig轻链，即它们包含轻链的可变区和恒定区二者，但是只包含重链的可变区和第一恒定区结构域（CH1）。单链抗体分子包含单链蛋白质，它包含Ig Fv片段。Ig Fv片段只包含抗体重链和轻链的可变区，其中不含恒定区。可以遵循Marks等人，1991，J. Mol. Biol., 222: 581 - 597中描述的流程来生成包含scFv DNA的噬菌体文库。为了分离期望抗体，可以与关于包含Fab DNA的噬菌体文库所述相似的方式进行对如此生成的噬菌体的淘选。

还应解释为本发明包括合成噬菌体展示文库，其中可以合成重链和轻链可变区，使得它们包含几乎所有可能的特异性（Barbas, 1995, Nature Medicine, 1: 837 - 839; de Kruif等人，1995, J. Mol. Biol., 248: 97 - 105）。

本发明还包括突变型FGF23。即本发明涵盖编码突变型FGF23的分离核酸及由其编码的蛋白质。应当解释为本发明意欲影响FGF23蛋白质的生物学活性或稳定性的所有突变。优选的是，突变与低血磷或高血磷状况有关，这些状况中的一些可能是可遗传的，诸如ADHR，正如本文展示的资料所证明的。正如本文实验详述部分所证明的，几种突变型FGF23使得FGF23比这种蛋白质天然存在的野生型更加稳定。这些稳定型FGF23因而可作为治疗性化合物用于治疗因血清磷酸盐水平升高而引起的FGF23相关疾病。本发明还涵盖包含编码（更加）稳定型FGF23的核酸的载体（包括那些其中所述核酸可操作连接启动

子/调控元件的载体)和细胞。

正如本文所公开的,已经鉴定了FGF23中导致FGF23蛋白质稳定性升高的突变。据显示,这些突变(包括但不限于R176Q、R179W、和R179Q)通过消除共有的蛋白酶切割位点从而抑制蛋白质降解来升高蛋白质稳定性。这些突变型FGF23的半衰期延长就治疗高血磷状况而言是一个明显的优点,因为有效治疗所必需的突变型FGF23施用频率可能显著低于天然FGF23。用任何氨基酸替代位于第176位和第179位任一的精氨酸的替代突变也将升高蛋白质稳定性。不应解释为本发明只限于本文所例示的突变。在本文的实验详述部分中,提供了使得本领域技术人员能够鉴定FGF23基因中的其它突变的足够传授,其中突变型FGF23与野生型FGF23相比可能具有增强的稳定性等。

本发明提供了能够在哺乳动物的细胞或体液中调控FGF23表达和/或活性的分子。

哺乳动物优选人。

术语FGF23活性的“调控剂”在用于本文时指影响本文定义的FGF23生物学活性的化合物,其中存在调控剂时的FGF23活性高于或低于缺乏该调控剂时的FGF23活性。

因此,调控剂可以是FGF23表达或活性的抑制剂或增强剂。抑制FGF23表达的调控剂包括但不限于可结合和/或切割FGF23编码核酸的反义核酸和核酶。

本发明提供了用于降低或消除FGF23蛋白质分子的FGF23抑制剂。这些抑制剂可以是上文所述的反义核酸或核酶。抑制剂还可以是用于通过RNA干扰来降低FGF23 mRNA水平的双链RNA分子(Elbashir等人, 2001, *Nature*, 411: 428-429; Carthew, 2001, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13: 244-248)。

本发明还提供了用于抑制FGF23生物学活性的FGF23抑制剂,包括但不限于阻断FGF23与其受体相互作用的分子或抑制FGF23受体激活的分子。具体范例包括但不限于FGFR2、FGFR4、和其它FGF23受体,以及可结合FGF23或其受体从而抑制FGF23生物学活性的抗体。

肽、和肽模拟物。因此，本发明涵盖任何类型的FGF23抑制剂，其中抑制剂抑制FGF23的表达或生物学活性。

根据本文公开的FGF23序列，熟练技术人员可以生成可用作FGF23的抑制剂的肽模拟物和其它小分子。具体而言，可以使用PCT/US93/01201中描述的技术来生成肽模拟物。

在参考本公开内容的情况下，鉴定FGF23表达或其生物学活性的调节剂就成了相对简单的工作。例如，可以使天然表达FGF23或在转染FGF23编码核酸后表达FGF23的细胞接触待测化合物。然后测量存在或缺乏待测化合物时的FGF23表达水平，其中存在待测化合物时的FGF23表达水平高于或低于缺乏待测化合物时的FGF23表达水平指示待测化合物是FGF23表达的调控剂。若存在待测化合物时的FGF23表达水平高于缺乏待测化合物时的FGF23表达水平，则认为待测化合物是FGF23表达的增强剂。相反，若存在待测化合物时的FGF23表达水平低于缺乏待测化合物时的FGF23表达水平，则认为待测化合物是FGF23表达的抑制剂。

类似的，可以测量哺乳动物细胞、血清、或尿液中的FGF23生物学活性。在这种情况下，测量存在或缺乏待测化合物时由细胞生成的FGF23生物学活性水平，其中存在待测化合物时的FGF23活性水平高于或低于缺乏待测化合物时的FGF23活性水平指示待测化合物是FGF23生物学活性的调控剂。若存在待测化合物时的FGF23活性水平高于缺乏待测化合物时的FGF23活性水平，则认为待测化合物是FGF23生物学活性的增强剂。相反，若存在待测化合物时的FGF23活性水平低于缺乏待测化合物时的FGF23活性水平，则认为待测化合物是FGF23生物学活性的抑制剂。

可以使用任何普通分子生物学技术来测量FGF23表达，例如使用RT-PCR技术、RNA酶保护、Northern印迹、等等。或者，可以通过可操作连接FGF23启动子序列与合适的报道基因并用得到的DNA构建物转染细胞来测量对表达的影响。可以通过测量接触待测化合物的细胞中的报道基因表达水平，并将这些细胞中的报道基因表达水平与不

接触待测化合物的细胞进行比较来测量应答待测化合物的启动子活性。合适的报道基因包括但不限于 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、绿色荧光蛋白、等等。

本发明提供了用于生成具有本文定义的FGF23生物学活性的分离多肽的方法。该方法包括在允许合成该蛋白质的条件下培养包含编码FGF23的载体的宿主细胞。随后由培养后的细胞和/或培养后的培养基分离蛋白质。可以通过常规手段包括制备性层析、亲和、和免疫学分离（涉及使用特异结合FGF23的抗体的亲和层析）来进行重组生成的蛋白质的分离和纯化。

本发明提供了诊断受试者体内的低血磷和高血磷紊乱的方法。在本文提供的一个范例中，资料证明患有ADHR的患者在FGF23中具有突变，而且FGF23可作为诊断工具用于检测ADHR。本文例示的方法包括使由患者获得的生物学样品接触检测FGF23（或FGF23突变）的试剂（其或是编码蛋白质的核酸或是蛋白质自身）。在样品中检测到或未检测到FGF23即可诊断FGF23相关低血磷和高血磷状况。

由受试者获得的生物学样品可以是其中可以检测FGF23核酸或蛋白质的任何流体或组织。优选的是，样品是血液或尿液。然而，不应解释为本发明限于由受试者获得的任何具体生物学样品。

用于检测FGF23核酸的优选试剂包括但不限于与编码FGF23的核酸互补的核酸。用于检测FGF23蛋白质的优选试剂包括但不限于抗体。进一步优选的是，这些试剂经过标记而便于检测FGF23核酸或蛋白质。根据本公开书，本领域技术人员将领会，可以使用多种合适标记物来标记用于检测FGF23的试剂，包括放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物、或酶。

本发明还包括低血磷状况的血清、血浆、或其它血液测定法，以及尿液或其它体液测定法。这些测定法可用于诊断患有上文所列低血磷疾病的患者。FGF23测定法是设计用于测量对应于FGF23片段的特定肽及FGF23的竞争性测定法。该测定法基于经标记 ^{125}I -FGF23肽与未标记肽（标准或未知数量的含FGF23体液）在每个反应混合物中结

合有限数量的FGF23肽特异性抗体的竞争。随着反应中标准或未知数量的增加，能够结合抗体的¹²⁵I-FGF23肽数量减少。通过测量¹²⁵I-FGF23肽的数量作为标准反应混合物中未标记FGF23肽浓度的函数，绘制标准曲线，由此可以测定体液中FGF23的浓度。

上文描述的竞争测定法设计用于量化患者生物学样品中存在的FGF23水平。通过比较指定患者样品中的FGF23多肽水平与已知未患有磷酸盐紊乱的患者，FGF23水平升高可用于指示指定患者患有低血磷紊乱。该测定法可用于许多低血磷紊乱，包括那些尚无遗传诊断手段的低血磷紊乱。可使用该测定法的低血磷疾病包括XLH、HHRH、HBD、ADHR、由肿瘤诱导的骨软化、表皮痣综合症、纤维性发育不良、和肾结石。例如，正如本文公开的，ADHR患者的FGF23水平将因该蛋白质中抑制其降解的突变而升高。

本发明还包括诊断患者体内由肿瘤诱导的骨软化的方法，其中患者肿瘤样品中FGF23的存在指示该疾病，正如本文公开的，可以将由患者切除的肿瘤样品进行设计用于检测FGF23的多种方法，包括但不限于RT-PCR、Northern印迹分析、和RNA酶保护测定法。因此，可以使用这种基于FGF23的流程而更加确定的诊断表现由肿瘤诱导的骨软化的临床症状的患者。

本发明提供了治疗患病动物体内的低血磷疾病的方法，其中对哺乳动物施用治疗有效量的降低FGF23表达和/或生物学活性的试剂。可以治疗的低血磷疾病包括但不限于X连锁低血磷佝偻病（XLH）、伴随高钙尿的遗传性低血磷佝偻病（HHRH）、低血磷骨病（HBD）、常染色体显性低血磷佝偻病（ADHR）、由肿瘤诱导的骨软化（TIO）或致癌低血磷骨软化（OHO）、表皮痣综合症、纤维性发育不良、肾结石、等等。正如本文公开的，低血磷疾病可以表征为FGF23的过度表达、降解FGF23的酶的突变或其它抑制、或FGF23中升高该蛋白质稳定性的突变，所有这些都导致磷酸盐流失升高并伴随血清磷酸盐水平降低。因此，降低FGF23表达和/或生物学活性的试剂将在低血磷患者中恢复正常的磷酸盐稳态。降低FGF23表达的试剂的范例包括但不

限于反义核酸和核酶。降低FGF23生物学活性的试剂的范例包括但不限于阻断FGF23与其受体之间相互作用的抗体和其它小分子。

本发明还提供了治疗哺乳动物体内的高血磷疾病的方法，其中对该哺乳动物施用治疗有效量的FGF23(或是核酸或是由其编码的多肽)或可升高FGF23多肽水平的试剂。可升高FGF23多肽水平的试剂的范例是蛋白酶抑制剂。正如本文展示的实施例中所述，FGF23受到SPC蛋白酶的降解，而且抑制SPC对FGF23的切割可延长其半衰期，导致FGF23水平升高。可以治疗的高血磷疾病包括但不限于轻度肾功能不全、肿瘤性钙沉积、等等。可以通过施用FGF23或升高FGF23水平的试剂来克服高血磷患者中升高的血清磷酸盐水平，二者都刺激磷酸盐流失，从而降低血清磷酸盐水平。可以通过标准基因治疗方法及直接注射FGF23多肽来施用FGF23，注射方法包括但不限于静脉内、皮下、和肌肉内注射。应当解释为本发明包括天然FGF23及突变型FGF23的施用，包括但不限于本文公开的用于升高FGF23蛋白质稳定性的突变体。

本发明还包括使用治疗有效量的表达FGF23的细胞群体来治疗高血磷疾病的方法。该方法可能是施用FGF23的有效方法，因为，正如本文所示，FGF23是分泌型蛋白质。本发明还包括为此目的施用表达突变型FGF23多肽的细胞。优选突变包括那些赋予FGF23多肽以升高的稳定性的突变，诸如本文公开的突变。

本发明还包括治疗哺乳动物体内的骨质疏松的方法，其中对哺乳动物施用治疗有效量的FGF23或升高FGF23表达的试剂。患有低血磷疾病XLH的患者遭受骨折的频率低于没有该疾病的患者(Econs等人, 1994, Bone and Min., 24: 17-24)。施用FGF23或升高FGF23水平的试剂将引起瞬时低磷血，并伴随对骨骼密度和强度的影响。因此，除了它在调控磷酸盐稳态中的作用，FGF23在体内可能还具有骨硬化功能。低磷血导致骨量增加的机制可能牵涉1,25-二羟基维生素D，但这并不意味着局限于这一理论。具体而言，间歇施用FGF23(或突变型FGF23)或升高FGF23表达的试剂可以瞬时降低磷酸盐再吸收，这

是一种刺激磷酸盐再吸收升高和1,25-二羟基维生素D（多种骨病的有效治疗剂）生成升高的反应。

本发明还提供了治疗哺乳动物体内牵涉钙和磷酸盐在动脉或软组织中沉积的状况，其中对哺乳动物施用治疗有效量的FGF23（或突变型FGF23）或升高FGF23表达的试剂，正如下文所述。由于血清磷酸盐水平升高，患有轻度肾功能不全的患者常常展示钙和磷酸盐在他们的冠状动脉及其它动脉中沉积。钙和磷酸盐二者在动脉壁中的沉积（称为冠状动脉病）引起通过这些动脉的血流减慢，而且能够导致心肌梗塞。因此，冠状动脉病的治疗将降低形成心肌梗塞的风险。

FGF23或升高FGF23水平的试剂将降低血清磷酸盐水平，从而保护高血磷患者免于心血管和冠状动脉病的加快。可以通过包括但不限于基因治疗的方法将编码FGF23的核酸投递至冠状动脉细胞。另外，组织特异性启动子的使用可以促进FGF23在血管平滑肌细胞或内皮细胞中的选择性表达。

类似的，FGF23或升高FGF23水平的试剂可用于治疗牵涉钙和磷酸盐在软组织中沉积的其它状况，包括但不限于皮肤炎和肿瘤性钙沉积。肿瘤性钙沉积是特征为肾磷酸盐再吸收升高和1,25-二羟基维生素D浓度升高的疾病。结果，患者形成软组织钙化，即钙和磷酸盐的沉积。使用本文所述任何手段对软组织施用天然或突变型FGF23将逆转这些生化缺陷。

本发明包括多种试剂盒，它们包含诸如编码FGF23的核酸、特异结合FGF23的抗体、与编码FGF23的核酸互补但就转录而言处于反义取向的核酸、和/或本发明的组合物、施用器、和描述使用该化合物来进行本发明方法的指导材料。虽然下文描述了示例性试剂盒，但是根据本公开书其它有用试剂盒的内容对于熟练技术人员而言将是显而易见的，它们都包括在本发明范围内。

一方面，本发明包括用于减轻由FGF23不当表达介导的疾病的试剂盒。依照本发明公开的方法使用试剂盒。简而言之，试剂盒可用于使细胞接触与编码FGF23的核酸互补且就转录而言处于反义取向的核

酸以降低FGF23表达,或可特异结合FGF23的抗体,其中FGF23表达、数量、或活性的降低介导有益作用。此外,试剂盒包含施用器和使用试剂盒的指导材料。这些指示仅仅收录了本文提供的实例。

试剂盒包含制药学可接受载体。以本文其它部分所列适当量提供组合物。另外,施用路径和施用频率如本文其它部分先前所列。

根据本文提供的公开书,熟练技术人员将领会,本发明涵盖包含核酶、反义组合物、特异结合FGF23的抗体、等等以降低FGF23水平的试剂盒。

另外,本发明包括包含编码哺乳动物FGF23的核酸的试剂盒。在需要升高FGF23的任何情况下,可以依照本发明的方法使用这种试剂盒。即,当疾病、紊乱、或状况与FGF23水平相对于正常的、无病的FGF23水平降低有关或由其介导时,可以依照本文其它部分公开的传授使用试剂盒,从而向FGF23水平低于相同但正常(即无病)的细胞的细胞和/或包含这种细胞的动物提供FGF23。本文公开的比非突变型更加稳定的突变型FGF23在这种试剂盒中特别有用。

制药学组合物

本发明还涵盖适当FGF23调控剂的制药学组合物用于实践本发明方法的用途,该组合物包含适当FGF23调控剂和制药学可接受载体。

在用于本文时,术语“制药学可接受载体”指可以联合适当FGF23调控剂且在联合后可用于对哺乳动物施用该适当FGF23调控剂的化学组合物。

可以1ng-100mg/kg/d的剂量来施用/投递可用于实践本发明的制药学组合物。

可以在口服固态配方、气雾剂、局部、或其它相似配方中全身施用可用于本发明方法的制药学组合物。除了适当FGF23调控剂,这些制药学组合物还可包含制药学可接受载体和已知增强和促进药物施用的其它成分。其它可能配方,诸如纳米微粒、脂质体、重封(resealed)红细胞、和基于免疫学的系统,也可用于依照本发明方法来施用适当

FGF23调控剂。

现在描述，可以配制使用本文所述任何方法鉴定的化合物，并施用于哺乳动物来治疗本文公开的疾病。

本发明涵盖制药学组合物的制备和使用，所述制药学组合物包含可用于治疗本文公开的疾病的化合物作为活性成分。这种制药学组合物可以只由活性成分组成，其中活性成分采取适用于施用于受试者的形式，或者制药学组合物可以包含活性成分和一种或多种制药学可接受载体、一种或多种额外成分、或其组合。活性成分可以生理学可接受的酯或盐的形式存在于制药学组合物中，诸如联合生理学可接受的阳离子或阴离子，正如本领域众所周知的。

在用于本文时，术语“制药学可接受载体”指可以联合活性成分且在联合后可用于对受试者施用活性成分的化学组合物。

在用于本文时，术语“生理学可接受”的酯或盐指与制药学组合物中的任何其它成分相容且对将要接受组合物的受试者无害的活性成分的酯或盐形式。

可以通过药理学领域已知的或以后开发的任何方法来制备本文所述制药学组合物的配方。一般而言，这些制备方法包括将活性成分联合载体或者一种或多种其它附加成分的步骤，然后（如果需要或希望）将产物成形或包装成期望的单剂或多剂单位。

虽然本文提供的制药学组合物的描述主要针对适用于人的处方施用的制药学组合物，但是熟练技术人员将理解，这些组合物通常适用于对所有类型的动物的施用。很好理解可以更改适合施用于人的制药学组合物使之适合施用于各种动物，而且普通熟练兽医药物学家只通过普通（如果有的话）实验就能够设计并进行这种更改。本发明所关注的将要接受本发明制药学组合物的受试者包括但不限于人和其它灵长类和其它哺乳动物。

可以适用于口服、胃肠外、肺部、鼻内、口腔、或其它施用路径的配方的形式来制备、包装、或销售可用于本发明方法的制药学组合物。关注的其它配方包括喷射的纳米微粒、脂质体制剂、包含活性成

分的重封红血球、和基于免疫学的配方。

可以散装、单一单位剂量、或多个单一单位剂量的形式来制备、包装、或销售本发明的制药学组合物。在用于本文时，“单位剂量”指包含预定数量的活性成分的离散数量的制药学组合物。活性成分的数量通常等于将要施用于受试者的活性成分的剂量或其方便分数，诸如这种剂量的二分之一或三分之一。

根据接受治疗的受试者的身份、身材和状况，进一步根据施用组合物的路径，本发明制药学组合物中活性成分、制药学可接受载体、和任何额外成分的相对数量将发生变化。作为范例，组合物可以包含0.1-100% (w/w) 的活性成分。

除了活性成分，本发明的制药学组合物还可包含一种或多种额外的制药学活性试剂。特别关注的额外试剂包括止吐剂和净化剂诸如氟化物和氟酸盐净化剂。

可以使用常规技术来生成本发明制药学组合物的受控或缓释配方。

可以离散固态剂量单位的形式来制备、包装、或销售适合于口服施用的本发明制药学组合物的配方，包括但不限于片剂、硬或软胶囊、扁囊剂、锭剂、或糖锭，每一个都包含预定数量的活性成分。适用于口服施用的其它配方包括但不限于粉状或粒状配方、水性或油性悬浮液、水性或油性溶液、或乳剂。

在用于本文时，“油性”液体指包含含碳液态分子且展示极性小于水的液体。

例如，可以通过活性成分（任选与一种或多种额外成分一起）的压制或模制来生成包含活性成分的片剂。可以通过在合适装置中压制活性成分的自由流动形式诸如粉状或粒状制剂（任选混合一种或多种粘合剂、润滑剂、赋形剂、表面活性剂、和分散剂）来制备压制片剂。可以通过在合适装置中模制活性成分、制药学可接受载体、和至少足以弄湿化合物的液体的混合物来生成模制片剂。用于制造片剂的制药学可接受赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、粒化和崩散剂、粘合剂、

和润滑剂。已知的分散剂包括但不限于马铃薯淀粉和淀粉乙醇酸钠(sodium starch glycollate)。已知的表面活性剂包括但不限于月桂基硫酸钠。已知的稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、乳糖、微晶纤维素、磷酸钙、磷酸氢钙、和磷酸钠。已知的粒化和崩散剂包括但不限于玉米淀粉和藻酸。已知的粘合剂包括但不限于明胶、阿拉伯胶、预胶凝玉蜀黍淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、和羟丙基甲基纤维素。已知的润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、硅土、和滑石粉。

片剂可以是未包被的，或者可以使用已知方法进行包被以实现在受试者胃肠道中的分解延迟，从而提供活性成分的缓释和吸收。作为范例，可以将诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯等物质用于包被片剂。进一步作为范例，可以使用美国专利号4,256,108、4,160,452、和4,265,874中描述的方法来包被片剂，形成释放受到渗透控制的片剂。片剂还可包含甜味剂、调味剂、着色剂、防腐剂、或其组合，以提供制药学上悦目且可口的制剂。

可以使用生理学可降解组合物诸如明胶来生成包含活性成分的硬胶囊。这些硬胶囊包含活性成分，而且还可以额外成分，包括例如惰性固态稀释剂，诸如碳酸钙、磷酸钙、或高岭土。

可以使用生理学可接受组合物诸如明胶来生成包含活性成分的软明胶胶囊。这些软胶囊包含活性成分，而且它可以混合水或油介质，诸如花生油、液体石蜡、或橄榄油。

可以以液态形式或意欲在使用前与水或其它合适载体进行重建的干燥产品的形式来制备、包装、和销售适合于口服施用的本发明制药学组合物的液态配方。

可以使用常规方法来制备液态悬浮液，以实现活性成分在水性或油性载体中的悬浮。水性载体包括例如水和等渗盐水。油性载体包括例如杏仁油、油酯、乙醇、植物油诸如落花生、橄榄、芝麻、或椰子油、分馏植物油、和矿物油诸如液体石蜡。液态悬浮液还可以包含一种或多种额外成分，包括但不限于悬浮剂、分散或润湿剂、乳化剂、缓和剂、防腐剂、缓冲剂、盐、调味剂、着色剂、和甜味剂。油性悬

浮液还可以包含增稠剂。已知悬浮剂包括但不限于山梨糖醇糖浆、氢化食用脂肪、褐藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄耆树胶、阿拉伯树胶、和纤维素衍生物诸如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟基丙基甲基纤维素。已知分散或润湿剂包括但不限于天然存在的磷脂诸如卵磷脂、烯基氧化物与脂肪酸、与长链脂肪醇、与由脂肪酸与己糖醇衍生的部分酯、或与由脂肪酸与己糖醇衍生的部分酯的缩合产物（分别是例如聚氧乙烯硬脂酸酯、十七烷基乙烯氧十六烷醇、聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯、和聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯）。已知乳化剂包括但不限于卵磷脂和阿拉伯树胶。已知防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、或正丙酯、抗坏血酸、和山梨酸。已知甜味剂包括例如甘油、丙二醇、山梨糖醇、蔗糖、和糖精。用于油性悬浮液的已知增稠剂包括例如蜂蜡、固体石蜡、和十六醇。

可以与液态悬浮液基本上相同的方式来制备活性成分在水性或油性溶剂中的液态溶液，主要区别在于活性成分是溶解而非悬浮于溶剂中。本发明制药学组合物的液态溶液可以包含就液态悬浮液而言描述的每一种成分，可以理解，悬浮剂将不再是帮助活性成分溶于溶剂所必需的。水性溶剂包括例如水和等渗盐水。油性溶剂包括例如杏仁油、油酯、乙醇、植物油诸如落花生、橄榄、芝麻、或椰子油、分馏植物油、和矿物油诸如液体石蜡。

可以使用已知方法来制备本发明制药学制剂的粉状和粒状配方。这些配方可以直接施用于受试者，用于例如形成片剂、填充胶囊、或通过向其添加水性或油性载体来制备水性或油性悬浮液或溶液。这每一种配方还可包含一种或多种分散或润湿剂、悬浮剂、和防腐剂。这些配方还可包含额外赋形剂，诸如填充物和甜味剂、调味剂、或着色剂。

还可以水包油乳剂或油包水乳剂的形式来制备、包装、或销售本发明的制药学组合物。油相可以是植物油诸如橄榄或落花生油、矿物油诸如液体石蜡、或其组合。这些组合物还可包含一种或多种乳化剂诸如天然存在的树胶诸如阿拉伯树胶或黄耆树胶、天然存在的磷脂诸

如黄豆或卵磷脂、由脂肪酸与己糖醇酐的组合衍生的酯或部分酯诸如山梨聚糖单油酸酯、和这些部分酯与环氧乙烷的缩合产物诸如聚氧乙烷山梨聚糖单油酸酯。这些乳剂还可包含额外成分，包括例如甜味剂或调味剂。

在用于本文时，制药学组合物的“胃肠外施用”包括特征为在物理上破坏受试者的组织并通过组织中的缺口施用制药学组合物的任何施用路径。因此，胃肠外施用包括但不限于通过注射组合物、经手术切口应用组合物、经穿透组织的非手术伤口应用组合物、等等来施用制药学组合物。具体而言，胃肠外施用试图包括但不限于皮下、腹膜内、肌肉内、胸骨内注射，和肾透析灌輸技术。

适用于胃肠外施用的制药学组合物的配方包含联合制药学可接受载体诸如水或无菌等渗盐水的活性成分。可以单位剂量形式来制备、包装、或销售这些配方，诸如含有防腐剂的安瓿或多剂量容器。用于胃肠外施用的配方包括但不限于悬浮液、溶液、水性或油性载体中的乳剂、糊剂、和可植入缓释或生物可降解配方。这些配方还可包含一种或多种额外成分，包括但不限于悬浮、稳定、或分散剂。在用于胃肠外施用的配方的一个实施方案中，提供干燥（即粉状或粒状）形式的活性成分用于在胃肠外施用下述重建组合物前与合适载体（如无菌无热原水）一起进行重建。

可以无菌可注射水性或油性悬浮液或溶液的形式来制备、包装、或销售制药学组合物。可以依照已知技术来配制这种悬浮液或溶液，而且除了活性成分，还可包含本文所述额外成分，诸如分散剂、润湿剂、或悬浮剂。可以使用无毒胃肠外可接受稀释剂或溶剂诸如水或1,3-丁二醇来制备这些无菌可注射配方。其它可接受稀释剂和溶剂包括但不限于Ringer氏溶液、等渗氯化钠溶液、和不挥发性油诸如合成的甘油单酯或二酯。有用的其它胃肠外可施用配方包括那些以微晶形式、在脂质体制剂中、或作为生物可降解聚合物系统的成分包含活性成分的配方。用于缓释或植入的组合物可以包含制药学可接受的聚合或疏水物质诸如乳剂、离子交换树脂、弱可溶性聚合物、或弱可溶性盐。

可以适合于经口腔进行肺部施用的配方来制备、包装、或销售本发明的制药学组合物。这种配方可以包含干燥颗粒，它包含活性成分，而且直径范围为大约0.5-7纳米，优选大约1-6纳米。这些组合物方便地采取干粉的形式，并使用包含干粉储存器（并向其通入一股推进剂以分散粉剂）的装置或使用自身推进性溶剂/粉剂分散容器诸如在密封容器中包含溶解或悬浮于低沸推进剂中的活性成分的装置进行施用。优选的是，这些粉剂包含这样的微粒，其中至少98%（指重量）的微粒的直径大于0.5纳米且至少95%（指数量）的微粒的直径小于7纳米。更优选的是，至少95%（指重量）的微粒的直径大于1纳米且至少90%（指数量）的微粒的直径小于6纳米。干粉组合物优选包含固态细粉稀释剂诸如糖，而且方便的以单位剂量形式提供。

低沸推进剂通常包括在大气压力下的沸点低于65°下的液态推进剂。通常，推进剂可以占到组合物的50-99.9%（w/w），而活性剂可以占到组合物的0.1-20%（w/w）。推进剂还可包含额外成分，诸如液态非离子或固态阴离子表面活性剂，或固态稀释剂（优选微粒大小与包含活性成分的微粒具有相同数量级）。

配制用于肺部投递的本发明制药学组合物还可以溶液或悬浮液液滴的形式提供活性成分。可以作为包含活性成分的水或稀醇溶液或悬浮液（任选无菌的）来制备、包装、或销售这些配方，而且可以使用任何喷雾装置而方便的施用。这些配方还可包含一种或多种额外成分，包括但不限于调味剂诸如糖精钠、挥发油、缓冲剂、表面活性剂、或防腐剂诸如甲基羧基苯甲酸。通过这种施用路径提供的液滴优选具有大约0.1-200纳米的平均直径范围。

可用于肺部施用的本文所述配方还可用于本发明制药学组合物的鼻内投递。

适合于鼻内施用的另一种配方是包含活性成分的粗粉，平均颗粒直径为大约0.2-500微米。以鼻吸的方式施用这种配方，即由凑近鼻孔的粉剂容器经过鼻道快速吸入。

适合于鼻施用的配方可以包含例如大约少至0.1%（w/w）和多至

100% (w/w) 的活性成分, 而且还可包含一种或多种本文所述额外成分。

可以适合于口腔施用的配方来制备、包装、或销售本发明的制药学组合物。这些配方可以采取例如使用常规方法制成的片剂或锭剂的形式, 而且可以包含例如0.1-20% (w/w) 的活性成分, 还包含口含可溶解或可降解组合物和任选的一种或多种本文所述额外成分。或者, 适合于口腔施用的配方可以包括包含活性成分的粉剂或雾化或喷雾化溶液或悬浮液。这些粉状、雾化、或喷雾化微粒或液滴的大小范围为大约0.1-大约200纳米, 而且还可包含一种或多种本文所述额外成分。

在用于本文时, “额外成分”包括但不限于一种或多种下列各项: 赋形剂、表面活性剂、分散剂、惰性稀释剂、粒化和崩散剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂、防腐剂、生理学可降解组合物诸如明胶、水性载体和溶剂、油性载体和溶剂、悬浮剂、分散或润湿剂、乳化剂、缓和剂、缓冲剂、盐、增稠剂、填充物、乳化剂、抗氧化剂、抗生素、抗真菌剂、稳定剂、和制药学可接受聚合或疏水物质。本发明制药学组合物中可以包含的其它“额外成分”在本领域是知道的, 描述于例如 Genaro 等人, 1985, 《Remington's Pharmaceutical Sciences》即《雷明顿氏药物科学》, Mack 出版公司, 伊斯顿, 宾夕法尼亚, 收入本文作为参考。

通常, 可以施用于动物(优选人)的本发明化合物的剂量范围是每千克动物体重1毫克-大约100克。施用的精确剂量将随任何数目的因素而变化, 包括但不限于待治疗的动物类型和疾病状况类型、动物年龄、和施用路径。优选的是, 化合物的剂量将在每千克动物体重大约1毫克-大约10克的范围内变化。更优选的是, 剂量将在每千克体重大约10毫克-大约1克的范围内变化。

可以每天几次的频率对动物施用化合物, 或者可以较低频率进行施用, 诸如每天一次、每周一次、两周一次、每月一次, 甚至更低频率, 诸如数月一次或甚至每年一次或更少。服药频率对于熟练技术人

页而言是显而易见的，而且将随任何数目的因素而变化，诸如但不限于待治疗疾病的类型和严重性、动物的类型和年龄、等。

保藏

根据布达佩斯条约关于用于专利程序用途的微生物保藏的国际识别的条款，于2000年6月14日将包含FGF23 DNA的核酸保藏于德国微生物和细胞培养物收藏中心（DSMZ），保藏号DSM 13530。

可以通过依照已知方法对保藏克隆进行测序而容易的测定保藏克隆的核苷酸序列。然后可以由这些保藏物确认氨基酸序列。此外，也可以通过肽测序而直接测定由保藏克隆编码的蛋白质的氨基酸序列，或在包含保藏的FGF23编码DNA的合适宿主细胞中表达蛋白质，收集蛋白质，并测定其序列。

申请人的受让人即高级研究和技术学院和慕尼黑路德维格-马克西米利安大学声称，DSMZ是提供永久保藏和公众易于获得（若被授予专利）的存放处。在授予专利后将不可撤消的消除对于公众获取如此保藏的材料的所有限制。在专利申请悬而未决期间由根据37 C.F.R. §1.14和35 U.S.C. §122授权的委员们确定的人将容易的获得材料。保藏材料将得到所有必要的小心维护，使之在最近一次提供保藏材料样品的请求之后至少五年内、而且在任何情况中在保藏日之后至少三十年内或专利执行期内（取二者之中较长的）保持存活且不受污染。申请人的受让人承认其在保藏机构因保藏条件而不能应请求而提供样品时更换保藏物的义务。

定义

下列每一项术语在用于本文时具有与它在这部分中相关的含义。

冠词“一个”和“一种”在用于本文时指一个/种或多于一个/种（即至少一个/种）冠词的语法宾语。作为范例，“一种元件”指一种元件或多于一种元件。

在用于本文时，短语“等位基因变体”指位于指定基因座的核苷

酸序列或由其编码的多肽。

在用于本文时，氨基酸表述成它们的全称、相应的三字母代码、或相应的单字母代码，正如下表所示：

全称	三字母代码	单字母代码
天冬氨酸	Asp	D
谷氨酸	Glu	E
赖氨酸	Lys	K
精氨酸	Arg	R
组氨酸	His	H
酪氨酸	Tyr	Y
半胱氨酸	Cys	C
天冬酰胺	Asn	N
谷氨酰胺	Gln	Q
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
甘氨酸	Gly	G
丙氨酸	Ala	A
缬氨酸	Val	V
亮氨酸	Leu	L
异亮氨酸	Ile	I
甲硫氨酸	Met	M
脯氨酸	Pro	P
苯丙氨酸	Phe	F
色氨酸	Trp	W

在用于本文时，“减轻”由FGF23介导或与其有关的疾病、紊乱、或状况。

术语“抗体”在用于本文时指能够特异结合抗原上的特定表位的

免疫球蛋白分子。抗体可以由天然来源或重组来源衍生的完整免疫球蛋白，而且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚物。本发明中的抗体可以多种形式存在，包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂、及单链抗体和人源化抗体(Harlow等人, 1999, 《Using Antibodies: A Laboratory Manual》即《使用抗体: 实验室手册》，冷泉港实验室出版社，纽约；Harlow等人, 1989, 《Antibodies: A Laboratory Manual》即《抗体: 实验室手册》，冷泉港实验室，纽约；Houston等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879 - 5883；Bird等人, 1988, Science, 242: 423 - 426)。

术语“合成抗体”在用于本文时指使用重组DNA技术而生成的抗体，诸如本文所述由噬菌体表达的抗体。该术语还可解释为指通过合成编码抗体的DNA分子而生成的抗体，该DNA分子表达抗体蛋白质，或表示抗体的氨基酸序列，其中DNA或氨基酸序列是使用本领域可利用的且众所周知的合成DNA或氨基酸序列技术获得的。

“反义”特别指编码蛋白质的双链DNA分子中非编码链的核酸序列或与非编码链基本同源的序列。根据本文的定义，反义序列与编码蛋白质的双链DNA分子的序列互补。反义序列不必只是与DNA分子编码链的编码部分互补。反义序列可以与编码蛋白质的DNA分子中编码链上指定的调控序列互补，该调控序列控制编码序列的表达。

术语“施用器”在用于本文时指用于对哺乳动物施用本发明的核酸、蛋白质、和/或组合物的任何装置，包括但不限于皮下注射器、移液器、喷雾器、等等。

基因“编码区”包含基因编码链的核苷酸残基和基因非编码链的核苷酸，它们分别与通过转录基因生成的mRNA分子的编码区同源或互补。

mRNA分子“编码区”也包含mRNA分子翻译过程中与tRNA分子反密码子区匹配的mRNA分子的核苷酸残基或编码终止密码子的核苷酸残基。因此，编码区可包含对应于成熟蛋白质中不存在的、由mRNA

分子编码的氨基酸残基（即蛋白质输出信号序列中的氨基酸残基）的核苷酸残基。

“与编码FGF23的核酸的部分或整个互补”指不编码FGF23蛋白质的核酸序列。相反，与编码FGF23的核酸分子的非编码链相同的序列不编码FGF23的蛋白质。

术语“互补”和“反义”在用于本文时不完全同义。“反义”特别指编码蛋白质的双链DNA分子中非编码链的核酸序列或与非编码链基本同源的序列。“互补”在用于本文时指两种核酸（如两种DNA分子）之间亚单位序列互补性的广义概念。当两种分子中的某个核苷酸位置被通常能够彼此碱基配对的核苷酸占据时，则认为核酸在该位置彼此互补。因此，当每种分子中较大数目（至少50%）的对应位置被通常彼此碱基配对（如A:T和G:C核苷酸对）的核苷酸占据时，则两种核酸彼此互补。根据本文定义，反义序列与编码蛋白质的双链DNA分子的序列互补。反义序列不必只与DNA分子编码链的编码部分互补。反义序列可以与编码蛋白质的DNA分子编码链上指定的调控序列互补，该调控序列控制编码序列的表达。

“同源”指两种聚合分子之间如两种核酸分子（如两种DNA分子或两种RNA分子）或两种多肽分子之间的亚单位序列相似性。当两种分子中的某个亚单位位置被相同单体亚单位占据时，如若两种DNA分子中的某个位置被腺苷酸占据，则它们在该位置是同源的。两种序列之间的同源性是匹配或同源位置数目的直接函数，如若两种复合序列中的半数（如长度为十个亚单位的聚合物中的五个位置）位置是同源的，则两种序列50%同源；若90%的位置（如10个中的9个）是匹配或同源的，则两种序列共享90%同源性。作为范例，DNA序列3'ATTGCC5'与3'TATGCG5'共享50%同源性。

若两种寡核苷酸在只有至少大约60%、更优选至少大约65%、甚至更优选至少大约70%、仍然更优选至少大约80%、且优选至少大约90%、或更优选至少大约95%互补的寡核苷酸才彼此退火的条件下发生退火，则这两种寡核苷酸“在高严谨度下”发生退火。用于使两种

寡核苷酸退火的严谨条件是温度、退火介质的离子强度、保温时间、寡核苷酸长度、寡核苷酸的GC含量、和两种寡核苷酸之间的预计非同源程度（如果知道的话）等因素的函数。调整退火条件的严谨度的方法是已知的（参阅例如Sambrook等人，1989，《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即《分子克隆：实验室手册》，冷泉港实验室，纽约）。

可以使用数学算法来实现两种核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比的测定。例如，可用于比较两种序列的数学算法是Karlin和Altschul的算法（1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264 - 2268），并经过Karlin和Altschul的修改（1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873 - 5877）。将这种算法掺入Altschul等人的NBLAST和XBLAST程序（1990, J. Mol. Biol., 215: 403 - 410），而且可以由例如具有全球资源定位器的美国生物技术信息中心（NCBI）环球网站点“<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>”获取。可以使用如下参数用NBLAST程序（在NCBI站点指派“blastn”）进行BLAST核苷酸搜索：缺口罚分 = 5；缺口延伸罚分 = 2；错配罚分 = 3；匹配得分 = 1；期望值10.0；词长(word size) = 11，以获得与本文所述核酸同源的核苷酸序列。可以使用如下参数用XBLAST程序（在NCBI站点指派“blastx”）或NCBI“blastp”程序进行BLAST蛋白质搜索：期望值10.0；BLOSUM62评分矩阵，以获得与本文所述蛋白质分子同源的氨基酸序列。

为了获得用于比较目的的带缺口比对，可以如Altschul等人（1997, Nucleic Acids Res., 25: 3389 - 3402）所述利用Gapped BLAST，或者，可以使用PSI-Blast或PHI-Blast来进行迭代搜索，它检测分子（Id.）之间的远缘关系和共享共有模式的分子之间的相互关系。在利用BLAST、Gapped BLAST、PSI-Blast、和PHI-Blast程序时，可以使用各种程序（如XBLAST和NBLAST）的缺省参数。参阅<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

可以使用与上文所述相似的技术来测定两种序列之间的百分比同一性，其中容许或不容许缺口。在计算百分比同一性时，通常对精确

匹配进行计数。

在用于本文时，术语“基因”和“重组基因”指包含编码本发明多肽的开放读码框的核酸分子。这些天然等位基因变异通常能够在指定基因的核苷酸序列中导致1-5%的变异。可以通过对大量不同个体中的目的基因进行测序来鉴定可变等位基因。这可以通过使用杂交探针鉴定多个个体中的相同遗传基因座而容易的进行。本发明的范围意欲包括任何和所有这些核苷酸变异及生成的氨基酸多态性或由天然等位基因变异产生的且不改变功能活性的变异。

“编码”指多核苷酸诸如基因、cDNA、或mRNA中特定核苷酸序列在生物学过程中担当合成其它聚合物和高分子的模板的内在特性，它们具有确定的核苷酸序列（即rRNA、tRNA、和mRNA）或确定的氨基酸序列及由其产生的生物学特性。因此，若对应于基因的mRNA在细胞或其它生物学系统中的转录和翻译生成蛋白质，则该基因编码蛋白质。编码链（即通常在序列表中提供的，与mRNA序列相同的核苷酸序列）和非编码链（用作基因或cDNA转录的模板）可以称为编码蛋白质或该基因或cDNA的其它产物。

除非另有说明，“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此互为简并版本且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可以包含内含子。

“表达载体”指包含重组多核苷酸的载体，所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作连接的表达控制序列。表达载体包含足够用于表达的顺式作用元件；可以由宿主细胞或在体外表达系统中提供其它表达元件。表达载体包括本领域已知的所有那些表达载体，诸如掺入了重组多核苷酸的粘粒、质粒（如裸露的或包含在脂质体中）、和病毒（如逆转录病毒、腺病毒、和腺伴随病毒）。

在用于本文时，术语“片段”在用于核酸时，核酸片段的长度通常可以是至少大约10个核苷酸、通常至少大约20个核苷酸、更通常的是大约20-大约50个核苷酸、优选至少大约50-大约100个核苷酸甚至更优选至少大约100-大约500个核苷酸、仍然甚至更优选至少大约500-大

约1000个核苷酸、且最优选超过大约1500个核苷酸。

在用于本文时，术语“片段”在用于多肽时，肽片段的长度通常可以是至少大约7个连续氨基酸、通常至少大约15个连续氨基酸、更通常的是至少大约30个连续氨基酸、通常至少大约40个连续氨基酸、优选至少大约50个氨基酸、甚至更优选至少大约60个氨基酸、且最优选超过大约70个连续氨基酸。

在用于本文时，术语“在严谨条件下发生杂交”意欲描述这样的杂交和清洗条件，其中彼此至少60%（65%、70%、优选75%）同一的核苷酸序列通常保持彼此杂交。这些严谨条件对于本领域技术人员而言是知道的，而且可以在《Current Protocols in Molecular Biology》即《分子生物学通用方案》，6.3.1-6.3.6, John & Sons, 纽约, 1989中找到。严谨杂交条件的范例是在6x 氯化钠/柠檬酸钠（SSC）中于45℃进行杂交，随后在0.2x SSC、0.1% SDS中于50-65℃清洗一次或多次。优选的是，在严谨条件下与SEQ ID NO: 1或3或其互补物的序列发生杂交的本发明分离核酸分子对应于天然存在的核酸分子。在用于本文时，“天然存在的”核酸分子指具有天然发生的核苷酸序列（如编码天然蛋白质）的RNA或DNA分子。

“基因组DNA”指具有与基因同源的核苷酸序列的DNA链。作为范例，染色体和通过逆转录哺乳动物mRNA衍生的cDNA都是基因组DNA。

在用于本文时，“同源性”与“同一性”同义。

另外，当术语“同源性”在用于本文时指核酸和蛋白质时，则应当理解为指核酸和氨基酸两种水平上的同源性。

在用于本文时，“指导材料”包括可用于传达本发明组合物用于其指定用途的有用性的发表物、记录、图表、或任何表达媒体。本发明试剂盒的指导材料可以例如粘贴在装有组合物的容器上或与装有组合物的容器一起运输。或者，指导材料可以与容器分开运输，目的是让接受者合作使用指导材料与组合物。

“分离核酸”指已经与天然存在状态中的侧翼序列分开的核酸区

段或片段，如已经消除了通常与该片段相邻的序列（如在片段天然存在的基因组中与其相邻的序列）的DNA片段。该术语还用于已经基本上由天然伴随核酸的其它成分（如在细胞中天然伴随核酸的RNA或DNA或蛋白质）纯化的核酸。因此，该术语包括例如掺入载体、自主复制质粒或病毒、或原核生物或真核生物基因组DNA，或者作为独立于其它序列的分开分子（如作为cDNA或通过PCR或限制酶消化生成的基因组或cDNA片段）存在的重组DNA。它还包括作为杂合基因的一部分、编码额外多肽序列的重组DNA。

在本发明的内容中，使用了下列普遍存在的核酸碱基的缩写。“A”指腺苷，“C”指胞苷，“G”指鸟苷，“T”指胸苷，而“U”指尿苷。

本发明肽（或编码肽的DNA）的“衍生物”和“变体”指一个或多个氨基酸（或一个或多个碱基对）可能遭到改变使得肽（或DNA）与本文所述序列不同但与本文公开的肽具有相同特性即具有FGF23生物学活性的肽。

术语“编码FGF23的核酸中的突变”指核酸序列中的碱基对变化，它可能改变蛋白质的结构或功能或者没有影响。有些突变（包括但不限于R176Q、R179Q、R179W、和这两个精氨酸的任何其它突变）影响蛋白质稳定性，因此可能影响在血液中的半衰期或其它生物学作用。

描述两种多核苷酸“可操作连接”指单链或双链核酸部分包含两种多核苷酸，它们在核酸部分中的排列方式使得两种多核苷酸中的至少一种能够对另一种发挥其特征性的生理学作用。作为范例，可操作连接基因编码区的启动子能够促进编码区的转录。

优选的是，当编码期望蛋白质的核酸还包含启动子/调控序列时，该启动子/调控序列位于期望蛋白质编码序列的5'端使得它驱动期望蛋白质在细胞中的表达。

在用于本文时，术语“启动子/调控序列”指表达与启动子/调控序列可操作连接的基因产物所需要的核酸序列。在有些情况中，该序列可以是核心启动子序列；在其它情况中，该序列还可以包含增强子序

列和表达基因产物所需要的其它调控元件。启动子/调控序列可以是例如以组织特异方式表达基因产物的序列。

“组成型”启动子指可操作连接编码或确定基因产物的多核苷酸时在细胞的大多数或所有生理学条件下引起基因产物生成的核苷酸序列。

“诱导型”启动子是当可操作连接编码或确定基因产物的多核苷酸时，使基因产物基本上只在细胞内存在对应于该启动子的诱导物时方生成基因产物的核苷酸序列。

“组织特异型”启动子指当可操作连接编码或确定基因产物的多核苷酸时基本上只在细胞是与启动子对应的组织类型的细胞时方在细胞中引起基因产物生成的核苷酸序列。

术语“核酸的表达”在用于本文时指合成由核酸编码的蛋白质产物。

术语“编码.....的DNA”应当解释为包括编码期望蛋白质的DNA序列和伴随实际编码序列的任何必需的5'或3'非翻译区。

术语“位于5'端”在用于本文时指启动子/调控序列共价结合在表达受其调控的核酸的5'端，而且与该核酸5'转录起始位点的距离近得足以驱动它们的表达。

向新生RNA转录本添加核苷酸的5'-3'方向称为转录方向。具有与mRNA相同序列的DNA链称为“编码链”；DNA链上位于DNA上参照点5'的序列称为“上游序列”；DNA链上位于参照点3'的序列称为“下游序列”。

“聚腺苷酸化序列”指指导向转录的mRNA序列上添加聚A尾的多核苷酸序列。

“多核苷酸”指核酸的单链或平行和反向平行链。因此，多核苷酸可以是单链或双链核酸。

术语“核酸”通常指大型多核苷酸。

术语“寡核苷酸”通常指小型多核苷酸，通常不超过大约50个核苷酸。可以理解，在将核苷酸序列表述成DNA序列（即A、T、G、C）

时,这也包括RNA序列(即A、U、G、C),其中“U”取代“T”。

在本文中使用常规符号来描述多核苷酸序列:单链多核苷酸序列的左手端是5'端;双链多核苷酸序列的左手端称为5'方向。

“引物”指能够与指定多核苷酸模板特异杂交并提供合成互补多核苷酸的起点的多核苷酸。当多核苷酸引物处于诱导合成的条件下时,即存在核苷酸、互补多核苷酸模板、和聚合剂诸如DNA聚合酶,发生这种合成。引物通常是单链的,但是可以是双链的。引物通常是脱氧核糖核苷酸,但是多种合成和天然存在引物可用于许多应用。因设计与模板杂交而与其互补的引物担当合成的起始位点,但是不必反映模板的精确序列。在这种情况下,引物与模板的特异杂交依赖杂交条件的严谨度。可以用例如显色、放射性、或荧光模块来标记引物,并用作可检测模块。

“探针”指能够与指定的另一种多核苷酸序列特异杂交的多核苷酸。探针可与互补多核苷酸靶发生特异杂交,但是不必反映模板的精确互补序列。在这种情况下,探针与靶的特异杂交依赖杂交条件的严谨度。可以用例如显色、放射性、或荧光模块来标记探针,并用作可检测模块。

“重组多核苷酸”指具有在自然状况下不连在一起的序列的多核苷酸。可以在合适载体中包含扩增或装配得到的重组多核苷酸,并且可以将载体用于转化合适的宿主细胞。

重组多核苷酸还可以承担非编码功能(如启动子、复制起点、核糖体结合位点、等)。

“重组多肽”指通过表达重组多核苷酸而生成的多肽。

在用于本文时,术语“报道基因”指可以使用已知方法来检测其表达的基因。作为范例,大肠杆菌*lacZ*基因可以在培养基中用作报道基因,因为*lacZ*基因的表达可以使用已知方法来进行检测,即向培养基中加入显色底物邻-硝基苯基- β -半乳糖苷(Gerhardt等人编,1994,《Methods for General and Molecular Bacteriology》即《普通和分子细菌学方法》,美国微生物学学会,华盛顿特区,第574页)。

“多肽”指由经肽键相连的氨基酸残基、与它们相关的天然存在的结构变体、和合成的非天然存在的类似物构成的聚合物、与它们相关的天然存在的结构变体、和合成的非天然存在的类似物。可以使用例如自动化多肽合成仪来合成多肽。

术语“蛋白质”通常指大型多肽。

术语“肽”通常指小型多肽。

在本文中使用时，使用常规符号来描述多肽序列：多肽序列的左手端是氨基端；多肽序列的右手端是羧基端。

限制性位点”指双链核酸中受到限制性内切酶识别的部分。

当双链核酸与限制性内切酶接触时，若内切酶能够在核酸的某个部分切割核酸的两条链，则该部分受到该内切酶的“识别”。

术语“特异结合”在用于本文时指化合物如蛋白质、核酸、抗体、等等识别并结合特定分子，但是基本上不识别或结合样品中的其它分子。

若两种寡核苷酸在只有至少大约60%、优选至少大约65%、更优选至少大约70%、甚至更优选至少大约75%、且优选至少大约90%、或至少大约95%互补的寡核苷酸才彼此退火的条件下发生退火，则这两种寡核苷酸“在高严谨度下”发生退火。用于使两种寡核苷酸退火的严谨条件是温度、退火介质的离子强度、保温时间、寡核苷酸长度、寡核苷酸的GC含量、和两种寡核苷酸之间的预计非同源程度（如果知道的话）等因素的函数。调整退火条件的严谨度的方法是已知的（参阅例如Sambrook等人，1989，《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即《分子克隆：实验室手册》，冷泉港实验室，纽约）。

在用于本文时，术语“基本纯的”指已经将化合物如核酸、蛋白质、或多肽与天然伴随它的成分分开。通常，当样品中所有物质的至少大约10%、优选至少大约20%、更优选至少大约50%、仍然更优选至少大约75%、甚至更优选至少大约90%、且最优选至少大约99%（指体积、湿重或干重、或者摩尔百分比或摩尔分数）是目的化合物时，则该化合物是基本纯的。可以通过任何适当方法如柱层析、凝胶电泳、

或HPLC分析来测量纯度。

当化合物如核酸、蛋白质、或多肽基本上不含天然相关成分或者与在它的天然状态下伴随它的天然污染物分开时，它也是“基本纯的”。因此，“基本纯的”核酸制剂在用于本文时指已经与天然存在状态中的侧翼序列纯化分开的核酸序列，如已经消除了通常在片段天然存在的基因组中与片段相邻的序列的DNA片段。

相似的，“基本纯的”蛋白质或多肽制剂在用于本文时指已经与其天然存在状态中的通常相关成分纯化分开的蛋白质或多肽。可以通过下列用于蛋白质纯化的已知流程来纯化得到基本纯的肽，其中使用免疫学、酶学、或其它测定法来监测流程中每个阶段的纯化。蛋白质纯化方法在本领域是众所周知的，而且描述于例如Deutscher等人，1990,《Guide to Protein Purification》即《蛋白质纯化指南》，Harcourt Brace Jovanovich，圣迭戈。

“标签”多肽指在经肽键连接目的蛋白质后可用于定位蛋白质、由细胞提取物纯化蛋白质、在结合测定法中用于固定蛋白质、或以其它方式研究蛋白质的生物学特性和/或功能的任何蛋白质。可以将包含“标签”表位的嵌合（即融合）蛋白固定在可结合标签的树脂上。这些标签表位和可特异结合它们的树脂在本领域是众所周知的，而且包括例如包含多个连续组氨酸残基的标签表位（His6）（能够在镍-次氨基三乙酸-琼脂糖上分离包含这种表位的嵌合蛋白）、血凝素（HA）标签表位（能够使包含这种表位的嵌合蛋白结合抗HA单克隆抗体亲和和基质）、myc标签表位（能够使包含这种表位的嵌合蛋白结合抗myc单克隆抗体亲和和基质）、谷胱甘肽-S-转移酶标签表位和麦芽糖结合蛋白（MBP）标签表位（分别能够诱导包含这种表位的蛋白质与谷胱甘肽或麦芽糖-Sepharose柱之间的结合）。包含这些标签表位的蛋白质的生成在本领域是众所周知的，而且描述于标准论文中，诸如Sambrook等人，1989和Ausubel等人，同上。同样，针对标签表位的抗体（如抗HA、抗myc抗体9E10、等等）能够在例如Western印迹、ELISA测定法、和细胞免疫染色中检测和定位融合蛋白。

在用于本文时，“治疗”指降低患者经历症状的频率。

在用于本文时，“FGF23抑制剂”定义为可降低或消除FGF23蛋白质分子或其生物学活性的任何分子。这些抑制剂可以是反义核酸或核酶、阻断FGF23与其受体相互作用的分子、或抑制FGF23受体激活的分子。下文讨论了具体范例。

术语“载体”在用于本文时指编码外源核酸的任何质粒或病毒。该术语还应当解释为包括促进核酸转移到病毒粒子或细胞中的非质粒和非病毒化合物，诸如聚赖氨酸化合物等等。载体可以是适合作为投递载体用于向细胞投递编码期望蛋白的核酸或其突变体的病毒载体，或者载体可以是适合于相同目的的非病毒载体。用于向细胞或组织投递DNA的病毒和非病毒载体的范例在本领域是众所周知的，而且描述于例如Ma等人，1997，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12744 - 12746。病毒载体的范例包括但不限于重组痘苗病毒、重组腺病毒、重组逆转录病毒、重组腺伴随病毒、重组禽痘病毒、等等（Cranage等人，1986，EMBO J., 5: 3057 - 3063；发表于1994年8月18日的国际专利申请号WO94/17810；发表于1994年10月27日的国际专利申请号WO94/23744）。非病毒载体的范例包括但不限于脂质体、DNA的聚胺衍生物、等等。

通过参照下列实验性实施例将进一步详述本发明。提供这些实施例只是出于例示目的，而非意欲限制，除非另有说明。因此，绝不能解释为本发明限于下列实施例，而是应当解释为涵盖根据本文提供的传授而变得明显的任何和所有变化。

实施例

实施例1：ADHR家族的连锁和突变分析

本文的资料证实了新基因FGF23的发现。下文还证实了下列发现：ADHR位于第12号染色体短臂的12p13.3，FGF23位于该区域，而且FGF23在患有ADHR的个体中发生突变。

现在描述此实施例所示实验中使用的材料和方法。

家谱分析

分析了源自英国（家族2318）、德国（家族329）、和美国（家族1406和1478）的家族的家谱。先前已经描述了ADHR+家族1406、1478、和2318（Econs等人，1992，J. Clin. Endocrinol. Metab., 82: 674-681; Bainchine等人，1971，Birth Defects Orig. Aric. Ser., 7: 287-295; Rowe等人，1992，Hum. Genet., 89: 539-542）。该研究得到了印地安那大学医学院和路德维格-马克西米利安大学医学系制度检查组的批准，而且所有患者都在参与前在知情下表示同意。

突变筛选

如下评估患者DNA：用内含子引物（表2）扩增外显子，并通过直接测序或SSCP分析扩增片段。在含有和不含甘油的情况下，使用标准聚丙烯酰胺或Serdogel SSCP 2x（Serva Electrophoresis GmbH，海德堡，德国）于20℃进行SSCP。通过Tt4cslistraGreen染色和荧光成像仪（Molecular Dynamics，桑尼维尔，加州）检测，或者通过存在 $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 的情况中PCR扩增外显子后的发射自显影来呈现样品。重扩增变体条带，用于测序。使用Taq DyeDeoxy Terminator Cycle sequencing kit即Taq染料脱氧终止物循环测序试剂盒（ABI），或者使用Sequenase Kit即测序酶试剂盒（USB）和 $[^{33}\text{P}]$ 双脱氧核苷酸掺入来进行使用有义和反义两种引物的直接测序。使用来自具有男性-男性传递和与ADHR相容的临床特征的四个家族即1406、1478、2318、和329的指示患者的DNA和来自患有低血磷佝偻病、PHEX基因突变呈阴性的18名患者的DNA进行突变分析。另外，还分析了患有低血磷、严重颅面异常、和上肢及下肢过短的家庭（Cabral等人，1998，80th Annual Endocrine Society Meeting即第80届内分泌学会年会）和患有HBD、包含男性-男性传递的家庭。

RT-PCR/RACE

使用1-2ng人或小鼠FGF23 cDNA（图5或6）作为模板进行RT-PCR。使用Marathon cDNA Amplification Kits即马拉松cDNA扩

增试剂盒 (ClonTech公司, 帕洛阿尔托, 加州) 进行RACE. 使用根据预测cDNA序列设计的引物扩增0.2-3.5kb产物 (表2), 提出请求后可以获得这些引物. 如Bonaventure等人, 1994, *Exp. Cell Res.*, 212: 97-104所述制备人胎软骨细胞培养物, 并检查COL2A1的表达.

现在描述此实施例中呈现的结果.

大型ADHR家谱即家族1406的连锁分析证明了标记D12S100与D12S397之间染色体12p13.3上的18cM间隔的显著LOD得分. 标记D12S1624的两点LOD得分是7.68. 第二个较小ADHR家族即家族1478展示D12S1624的LOD得分是1.1. 假设该家族的疾病基因座与相同间隔连锁, 那么在这两个家族中筛选单一重组事件, 并将疾病基因座对标记D12S1585与D12S1594之间的1.5MB区域进行作图 (图2). 在家族1406中, 个体1306和0142在D12S1685具有近端重组事件, 而在D12S397具有远端重组事件. 家族1478分别在个体001和0100中的D12S1050和D12S1594展示重组 (图1A).

可以由公开的人类基因组成果获得来自12p13.3的基因组序列. D12S685与D12S1623之间的已完成和未完成序列的分析揭示在该区域内有37个基因, 其中13个是新的. 通过IMAGE克隆的RT-PCR、RACE、和/或测序获得新基因的完整编码序列.

根据上述连锁研究, 将突变筛选集中于D12S1685与D12S1594之间的1.5MB区域. 该区域包含7个已知基因、4个新基因、和1个基因片段 (表1). 使用基于外显子-内含子边界的引物通过扩增外显子对下列基因筛选突变: (1)MIBO3 (AJ272206); (2)DYRK4蛋白激酶 (AF263541); (3)蛋白激酶A结合蛋白AKAP110 (AF093408); (4)GalNAc-T8 (AJ271385) 9. 另外, 认为该区域以外的数个基因是候选者. 调查了其中两个, 即生长分化因子3 (GDF3, AF263538) 和新的G蛋白偶联受体 (GPCR46, AJ272207). 检测到少数变异, 而且对照等位基因的测序揭示了它们都是多态性 (表1).

表 1

编号	基因符号	ORF (aa)	外显子	pter-qter	多态性
M90813	CCND2	289			
AJ272206*	C12orf5	270	6	正向	716C/T(T293M)
AF263537	FGF23	251	3	反向	
X63454	FGF6	198	3	反向	
AJ272205	C12orf4	552	14	反向	
AF006259	PIR51	335	9	正向	
AF263541*	DYRK4	>541	>11	正向	351C/T(V117V) 632A/G(N211S) 1041C/T(A347A)
AF093408*	AKAP3	853	5	反向	
AF050641	NDUF49	377	11	正向	
AJ271385*	GALNT8	637	11	正向	800A/G(E267G)
X17622	KCNA6	529	1	正向	
L02750	KCNA1	495	1	正向	

还调查了来自该区域的新型成纤维细胞生长因子家族成员 FGF23。来自上述ADHR家族的FGF23外显子的直接测序揭示了三个错义变化，它们影响相隔三个氨基酸的两个精氨酸。家族1406和1478共享相同变化R176Q (527>A)，它破坏了AciI位点。在通过琼脂糖凝胶电泳进行分析时，对照PCR产物被消化成112、49、和33bp的片段，而突变体基因座只产生112和82bp片段。在家族2318中，找到了突变型FGF23中的R179W (535C>T)变化，它产生了新的BmpI位点。RFLP分析显示来自正常等位基因的PCR产物未被消化，保持194bp的原始产物，而突变型等位基因被切割一次，产生118和87bp片段（图1B）。在家族329中，找到了突变型FGF23中的R179Q (536G>A)变化，它不产生或破坏限制性位点。另外，在外显子3中存在多态性716/T(239/M)。在214个等位基因的182个中找到苏氨酸，而在214个等位基因的22个中找到甲硫氨酸。完整编码区和起始密码子上游区域

(450bp)的测序揭示在患有HBD的家族、患有低血磷和多发性先天性畸形的家族、和患有XLH的18名患者中没有突变。错义突变与每个家族中的疾病相分离,而且在214个测序的对照等位基因中没有找到。另外,分别通过800和752个对照等位基因的RFLP分析排除了家族1406和1478中和家族2318中的突变(图1B)。具有相同FGF23突变的家族1406和1478来自分开的地理区域,而且知道是无关的。证据之一是两个家族在分别距离突变基因只有200kb和70kb的基因座D12S1624和D12S1725处具有不同的等位基因。总之,显然FGF23突变R176Q、R179Q、和R179W是ADHR的起因。

FGF23在人类基因组中位于FGF6端粒侧54kb,是由3个外显子构成的,跨越大约10kb基因组序列。获得的最长的FGF23 RT-PCR产物有1612bp,而且包含251个氨基酸的预测开放读码框(ORF)。5'-UTR由146bp构成,其中预测起始位点上游不含符合读码框的终止密码子。3'-UTR由710bp构成,其中预测聚腺苷酸化信号在终止密码子下游831bp。通过PFAM数据库的FGF文件(4.6e-14、1.9e-16)鉴定了人和小鼠FGF23。使用CLUSTAL和PRETTYBOX生成了FGF23与其它FGF家族成员之间的氨基酸序列比对(图3A-3C)。它们与其它FGF家族成员在共有核心序列中共享25% - 36%的氨基酸同一性。树分析指示FGF23与FGF21最密切相关。考虑到FGF23具有251个氨基酸的事实,它是迄今最大的FGF特征为该蛋白质具大型C端部分。Signal P分析指示FGF23包含信号肽,而且对肽的切割最有可能位于第24位丙氨酸残基与第25位酪氨酸残基之间。

对来自小鼠6号染色体的BAC在人染色体12p13.3的同源区域内测序。这些BAC之一(GenBank编号ACO15538)包含FGF23的小鼠同系物。使用由对应区域衍生的引物由17天小鼠胚胎cDNA扩增FGF23。鼠cDNA具有与人蛋白质相同长度的预测ORF,在核苷酸水平具有73%同一性,而在氨基酸水平具有70%同一性。另外,斑点印迹分析指示起始密码子上游500bp的小鼠与人序列具有显著的序列保守性。

实施例2: FGF23的表达

本文的资料证实了FGF23在人组织和癌细胞系中的表达。在此实施例中还证实了FGF23特异抗体的生成及其用于检测在细菌和哺乳动物细胞中生成的FGF23的用途。此实施例中展示的资料还证实了FGF23是分泌性蛋白质,而且FGF23在致癌性低血磷骨软化(OHO)肿瘤中丰富表达。

现在描述在此实施例所述实验中使用的材料和方法。

Northern印迹分析

将含2 μ g polyA⁺-RNA的来自多种组织的多组织Northern印迹(Clontech公司, 帕洛阿尔托, 加州)与全长FGF23(图5A或6A)探针在杂交缓冲液(270mM NaCl、15mM Na₂HPO₄、15mM EDTA、1% SDS、10% 硫酸葡聚糖、0.5% 脱脂奶粉)中于65℃保温,并在0.01X SSC中于60℃清洗。

在细菌中生成FGF23

使用Pfu聚合酶(Gibco-BRL, 罗克维尔, 马里兰州)通过PCR扩增来自人心的RNA(Clontech公司, 帕洛阿尔托, 加州)而生成FGF23 cDNA。使用IV型Qiaexpress试剂盒(Qiagen公司, 巴伦西亚, 加州)将包含第73-756位核苷酸、编码不含预测信号肽的全长FGF23的插入片段定向克隆到pQE30载体中, 读码框与N端6xHis标签相同。随后使用质粒FGF23-6xHis pQE转化M15[pREP4]细胞, 并加入IPTG达4小时以诱导蛋白质表达。如制造商(Qiagen公司, 巴伦西亚, 加州)所述, 通过镍层析小量制备纯化FGF23-6xHis蛋白质。

Western印迹分析

将蛋白质样品和标准物在15% SDS-PAGE微型凝胶(BioRad)上进行电泳, 并电转移到硝酸纤维素膜上。将膜与2.5 μ g/ml抗人FGF23抗体或小鼠抗penta His抗体一起保温, 随后与山羊抗兔或抗小鼠-HRP二抗(1:1000)(Amersham公司, 皮斯卡塔韦, 新泽西州)一起保温, 并通过增强型化学发光(ECL)(Amersham公司, 皮斯卡塔韦, 新泽西州)显现。

在哺乳动物细胞中生成FGF23

为了在哺乳动物细胞中生成FGF23, 用表达人FGF23的质粒(称为pFGF23)瞬时转染OK-E、COS-7、和HEK293细胞。为了构建pFGF23, 通过RT-PCR由心总RNA扩增Kozak序列居前的FGF23 ORF(第-3至756位bp)。将得到的cDNA定向插入表达质粒pcDNA3.1(+)(Invitrogen)。通过DNA测序确认了pFGF23的完整性。

OHO肿瘤样品的制备

通过来自: 1)左腿(血管外皮细胞瘤); 2)下颚(混合型结缔组织瘤); 3)左腿(血管发育不良); 4)足底(血管外皮细胞瘤); 5)鼻(血管外皮细胞瘤); 和6)远端股骨(成骨细胞骨肉瘤)的手术切除由OHO患者获得了6种不同肿瘤(图8A)。所有患者都展示OHO的特征性生化异常, 它们在切除肿瘤后消除。将大约100mg肿瘤样品重悬于0.5ml冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)(添加了75 μ g/ml AEBSF蛋白酶抑制剂)。将样品在冰上匀浆30秒钟, 然后以1500g离心, 将澄清的匀浆物用于进一步的实验。通过Bradford蛋白质测定法(Bio-Rad公司, Hercules, 加州)测定蛋白质浓度, 以牛血清清蛋白作为标准。

现在描述这部分中呈现的实验结果。

为了评估FGF23在特定人组织及癌细胞系中的表达, 依照常规方法, 对由人组织和癌细胞系获得的RNA进行RT-PCR和杂交分析。显示FGF23在特定组织诸如人心、肝、和甲状腺/甲状旁腺中以低水平转录(图4A)。另外, 可以由全胎、胎儿软骨、小肠、睾丸、和骨髓肌扩增到微弱产物。肺、脑、肾、骨肉瘤细胞(SaOS)、和内皮细胞(HMEC-1)对FGF23转录本呈阴性。在小鼠中, 嵌套RT-PCR在17天小鼠胚胎中呈阳性, 但是在来自颅盖的原代骨细胞培养物、肢芽细胞、成骨细胞(MC3T3细胞)、和受刺激软骨细胞细胞系中不是如此。小鼠胚胎不同发育阶段的矢状切片及各种组织诸如成年肺、卵巢、胰、睾丸、胸腺、肾、脑、和心的石蜡切片和E18.5胫骨的冷冻切片的放射性原位杂交对FGF23转录本呈阴性。来自16种特定器官的多种组织Northern印迹杂交呈阴性。在用FGF23 cDNA进行探查时, 由癌细胞

系获得的RNA的Northern印迹分析在慢性骨髓性白血病细胞系K562中展示大约3和1.3kb的阳性信号，而数种其它肿瘤细胞系只表达3.0或1.3kb转录本（图4B）。

为了生成可用于检测FGF23的免疫学试剂，使用标准流程生成针对肽CSQELPSAEDNSPMASD-COOH（SEQ ID NO: 5）的兔抗人FGF23多克隆抗体，该肽对应于人FGF23的第206-222位残基（Zymed Laboratories公司，南圣弗朗西斯科，加州）。针对该肽亲和纯化抗血清。

为了评估抗FGF23抗体的特异性，如上所述在细菌中生成重组人FGF23。通过Western印迹分析使用亲和纯化的抗FGF23抗体分析由FGF23-6xHis pQ转化细菌制备的裂解物。抗FGF23抗体识别来自经IPTG诱导的细菌的大约27kDa蛋白质，而在未诱导的培养物中没有检测到蛋白质（图7A）。使用抗His抗体也检测到相同蛋白质，指示两种抗体可识别相同蛋白质。免疫前血清在所有实验中都未能检测到蛋白质。这些结果确认了亲和纯化的抗FGF23抗体能够识别重组人FGF23蛋白质。

为了评估FGF23在转染细胞中的表达，在转染后24小时收获细胞，提取总RNA，并使用³²P标记FGF23 cDNA探针进行Northern印迹分析。在用pFGF23转染的所有三种细胞系中，1.1kb的单一mRNA种类与FGF23探针杂交，而用空pcDNA3.1转染的细胞不表达FGF23转录本（图7B）。

为了确定FGF23是否是分泌性蛋白质，使用由三种转染细胞系衍生的条件培养基和抗FGF23抗体进行Western印迹分析。在由pFGF23转染细胞获得的条件培养基中检测到大约32kDa和12kDa的免疫反应性蛋白质，但是在pcDNA3.1转染细胞中没有检测到（图7C）。32kDa条带是FGF23的成熟形式，而12kDa种类代表FGF23的C端降解产物，因为只是在延长细胞在无血清培养基中的保温后检测到该较小条带。另外，分泌型FGF23比它的预测大小要大，这最有可能的是由于核心糖基化所致，正如存在胰微颗粒时pFGF23的体外转录和翻译所测试

的。综上所述，这些结果证明了瞬时表达FGF23的哺乳动物细胞能够生成FGF23转录本且有效分泌该蛋白质。

为了评估OHO肿瘤中的FGF23表达，使用由6种肿瘤中的5种分离的总RNA进行Northern印迹分析。放射性标记的FGF23探针与所有5种肿瘤中的3.0和1.3kb FGF23转录本及大约2.0kb微弱条带杂交；相反，来自数种其它组织的对照RNA不展示杂交条带（图8A）。为了确定OHO肿瘤中是否存在FGF23蛋白质，通过Western印迹分析使用抗FGF23抗体检验来自第6种肿瘤的提取物。FGF23抗体由肿瘤提取物检测到32kDa蛋白质（图8B）。总之，Northern和Western印迹分析指示FGF23是在OHO肿瘤中高度表达的分泌性蛋白质。

实施例3：ADHR突变对FGF23蛋白质切割和肝素结合的影响

本文的资料证实了与ADHR有联系的FGF23突变导致FGF23的较大蛋白质种类的水平升高，这是由于蛋白酶不能在共有SPC位点有效切割FGF23。此实施例中还证实了突变型FGF23与野生型FGF23可比的水平结合肝素的能力。

现在描述此实施例所述实验中使用的材料和方法。

FGF23的诱变

使用嵌套PCR和定点诱变方法将ADHR错义突变R176Q、R179W、R179Q导入FGF23 cDNA。在所有PCR反应中使用高保真DNA聚合酶Pfu（Promega公司，麦迪逊，威斯康星州），使用pFGF23（pcDNA3.1主链）作为模板。对于PCR的起始轮，将包含适当错义的每种正向诱变引物与反向3' FGF23引物配对，并将每种反向诱变引物与正向5' FGF23引物配对。下文表2列出了诱变引物。分别位于5' FGF23和3' FGF23引物内的BamHI和EcoRI位点以斜体和双下划线标明。每种引物内的突变碱基以下划线标明。

表 2

引物名称/SEQ ID NO:	引物取向	序列 (5'-3')
5'FGF23 引物 (SEQ ID NO:6)	正向	CGGGATCCACGATGTGG
3'FGF23 引物 (SEQ ID NO:7)	反向	GGAATTCCTAGATGAACT
R176Q (G527A) (SEQ ID NO:8)	正向	ATACCACGGCAGCAGAC
R176Q (G527A) (SEQ ID NO:9)	反向	CCGGGTGTGCTGCCGTG
R179W (C535T) (SEQ ID NO:10)	正向	GCGGCACACCTGGAGCG
R179W (C535T) (SEQ ID NO:11)	反向	TCGGCGCTCCAGGTGTGC
R179Q (G536A) (SEQ ID NO:12)	正向	CGGCACACCCAGAGCGC
R179W (G536A) (SEQ ID NO:13)	反向	CTCGGCGCTCTGGGTGTG

所有实验的 PCR 条件是: 95℃ 1min, 随后是 35 个循环的 95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 2min, 最后延伸 72℃ 7min. 使用 Wizard Prep Kit 即 Wizard 制备性试剂盒 (Promega 公司, 麦迪逊, 威斯康星州) 凝胶纯化由第一轮 PCR 得到的 cDNA 产物. 进行第二轮 PCR 生成全长突变 cDNA. 由特定突变体的两个最初 PCR 反应各取 1 μl, 在一个反应管中混合, 并用 5' FGF23 和 3' FGF23 引物扩增这两种 cDNA 的混合物. 然后用 BamHI 和 EcoRI 消化得到的产物, 并定向连接到表达载体 pcDNA3.1(+) 中, 以生成突变克隆 pR176Q, pR179W, pR179Q. 将每种突变克隆插入片段测序, 以确认导入了适当突变及评估 ORF 的完整性.

FLAG 标记 FGF23 的构建

用正向引物 (含 EcoRI 位点, 下划线) 5' -GGAATTCATATCCCAATGCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 7) 和反向引物 (含 BamHI 位点, 下划线) 5' -CGGGATCCCTAGATGAACTTGGCGAA-3' (SEQ ID NO: 6) 分开扩增 pFGF23 和 pR176Q. 用 EcoRI 和 BamHI 消化得到的 cDNA, 并定向连接到 pFLAG-CMV-3 表达载体 (Sigma-Aldrich 公司, 圣路易斯, 密苏里州) 中, 以生成表达 FLAG-FGF23 和 FLAG-R176Q 的质粒. 应当注意, 亲本 pFLAG-CMV-3 载体使用前胰蛋白酶原前导序列, 从而

能够分泌N端FLAG标记融合蛋白。将克隆的插入片段测序，以确认融合蛋白的正确读码框。

肝素结合测定法

将由经转染HEK293细胞获得的条件培养基(0.5ml)以1:1与1X PBS pH7.4及50 μ l 1:1 肝素sepharose:1X PBS(Amersham Pharmacia公司, 皮斯卡塔韦, 新泽西州)悬浮液一起保温。将混合物置于4℃旋转摇床上达4小时, 然后离心1分钟。除去上清液, 并用冰冷的1X PBS清洗sepharose四次。向sepharose中加入50 μ l Laemmli加样缓冲液, 并将悬浮液简短漩涡振荡, 然后煮沸5分钟。将样品离心1分钟, 并取出上清液。通过Western印迹分析使用抗FGF23抗体分析10 μ l上清液(结合肝素sepharose的物质)。

现在描述此实施例中呈现的实验结果。

为了评估ADHR突变型FGF23在哺乳动物细胞中的表达和分泌, 如上所述构建包含ADHR错义突变(R176Q、R179W、R179Q)的FGF23表达质粒。预测信号序列和预测蛋白酶切割位点位于FGF23氨基酸序列内(图9)。通过用表达野生型FGF23、R176Q、R179W、和R179Q的质粒转染HEK293细胞来分析突变型FGF23的表达和分泌。使用针对人FGF23的多克隆抗体对由转染细胞衍生的条件培养基和总细胞裂解物进行Western印迹分析。在由pFGF23转染细胞获得的条件培养基中检测到大约32kDa的免疫反应性蛋白质和位于12kDa的双带(图10A)。相反, 在由突变型pFGF23转染细胞获得的条件培养基中只检测到32kDa条带, 而且野生型与突变型FGF23之间的表达水平没有明显差异(图10A)。另外, 总细胞裂解物对野生型或突变型FGF23蛋白质呈阴性, 经载体对照转染的细胞也如此(图10A)。图10B显示了突变型FGF23蛋白质中的氨基酸变化。这些结果指示瞬时转染的哺乳动物细胞系分泌包含人ADHR突变的FGF23。然而, 使用多克隆抗体在来自表达突变型FGF23的细胞的培养基中只能检测到该较大蛋白质种类。应当注意, 抗FGF23抗体识别的表位位于野生型FGF23蛋白质中第176-179位残基即潜在SPC切割位点的C端, 因此12kDa条带可能代

表了FGF23 32kDa种类的C端片段。若12kDa种类是32kDa条带的降解产物，则SPC切割位点上游的抗体应可结合较大蛋白质种类及N端蛋白质片段。

使用如上所述构建的表达N端FLAG表位标记的野生型和突变体(R176Q) FGF23的质粒精确测试了这种可能性。为了确定针对该蛋白质N端的抗体能否检测FGF23蛋白质种类，用载体对照或表达FLAG-FGF23和FLAG-R176Q的质粒瞬时转染HEK293细胞。通过Western印迹使用抗FLAG单克隆抗体(M5; Sigma-Aldrich公司，圣路易斯，密苏里州)分析由转染细胞获得的条件培养基。在由FLAG-FGF23转染细胞获得的条件培养基中，抗FLAG抗体识别36和26kDa两条带，而在由FLAG-R176Q转染细胞获得的培养基中，抗体主要识别36kDa条带，在26kDa能检测到很微弱的条带(图11A)。载体对照培养物未生成反应性条带，任何细胞裂解物也是如此。在培养基中检测到的较大FLAG-FGF23蛋白质种类迁移至36kDa，与上文观察到的32kDa相反，这是因为来自FLAG标签的额外残基所致。使用检测36kDa野生型和突变型FLAG标记FGF23的多克隆抗FGF23抗体，通过相同培养基的Western印迹分析确认了这一点。图11B显示了FLAG表位、抗FGF23表位、和SPC切割位点的位置。这些结果指示来自野生型FGF23的Western印迹中的较小条带确实是FGF23的C和N端片段，而且ADHR突变型FGF23主要是作为较大蛋白质种类分泌的。这些结果指示位于第176位和第179位的ADHR突变稳定了32kDa FGF23蛋白质种类。根据与ADHR患者磷酸盐流失有关的突变型FGF23的切割不如野生型FGF23有效的观察结果，全长FGF23的稳定和分泌有可能导致肾磷酸盐流失，与蛋白水解片段的分泌相反。另外，这些结果说明ADHR突变有可能增强而非灭活FGF23在磷酸盐流失作用中的生物学活性。

为了确定使用HEK293细胞观察到的FGF23切割是发生在细胞内还是细胞外，将FGF23条件培养基在缺乏细胞或与对照HEK293细胞(不表达FGF23)一起的情况下于37℃在5% CO₂中保温24小时。保温

后, 收集培养基, 浓缩至相同体积, 并使用C端抗FGF23抗体进行Western印迹分析。不管采用哪种处理, 32kDa条带与12kDa条带的比率没有变化(图12A), 指示FGF23切割发生于细胞内, 在细胞分泌之前或之中, 而不是在HEK293细胞上表达的胞外蛋白酶的作用所致。平行电泳这些样品的考马斯蓝染色确认了相同凝胶上样量(图12B)。

位于R176和R179的ADHR突变邻近包含FGF肝素结合基序的 β 链。为了测试ADHR突变是否干扰FGF23结合肝素的能力, 如上所述将由经表达野生型或突变型FGF23的质粒转染的HEK293细胞获得的条件培养基与肝素sepharose一起保温。在野生型和突变型FGF23转染细胞培养基的样品中检测到32kDa蛋白质种类, 而空载体转染细胞培养基的样品呈阴性, 指示野生型和突变型FGF23都有效结合肝素(图13)。在使用由经表达FLAG标记FGF23的质粒转染的细胞获得的培养基的相似实验中, 36kDa种类即FLAG标记野生型和突变型FGF23也结合肝素(图13)。这些结果证明了FGF23 32kDa种类可特异结合肝素, 并且为FGF23确实是结合肝素的FGF家族成员提供了生化证据。另外, 突变型FGF23保留了肝素结合的观察结果指示ADHR错义突变不显著改变FGF23的蛋白质结构。

实施例4: 小鼠中的FGF23分析

本文的资料证实了过度表达FGF23、表达突变型FGF23、或暴露于贫乏或富含磷酸盐食谱的小鼠的生成和分析。

为了评估FGF23表达与小鼠中磷酸盐稳态改变之间的相关性, 构建了在肝中过度表达鼠FGF23的转基因小鼠, 并比较了来自转基因与对照小鼠的血清和尿液样品中的磷浓度。将小鼠定期称重并检查, 以确定是否有任何外在的表型差异。与在与肾磷酸盐流失有关的人肿瘤中过度表达FGF23一致的是, 过度表达FGF23的转基因小鼠应当展示肾磷酸盐流失及由此引起的低血磷。此外, 这些小鼠应当展示肾中Npt2 (主要的依赖钠的磷酸盐转运蛋白) mRNA和蛋白质水平降低。在FGF23转基因小鼠、对照小鼠、与通过膳食磷酸盐贫乏或过量的诱导

而具有等同血清磷酸盐浓度的对照小鼠之间比较血清1,25-二羟基维生素D浓度水平。相似的，注射纯化FGF23的小鼠应当展示肾磷酸盐流失，并且成为低血磷。

构建包含在人ADHR患者中观察到的相同突变（R176Q、R179Q、R179W、或者第176位或第179位精氨酸的任何其它突变）的转基因小鼠，它们应当能够用作人类紊乱的优良动物模型。如上所述，检验血清和尿液磷及血清1,25-二羟基维生素D浓度。该突变杂合的小鼠应当表现与患有ADHR的人一样的肾磷酸盐流失和低血磷，而突变纯合小鼠应当具有更严重的表型。突变小鼠还应当展示肾中Npt2 mRNA和蛋白质水平降低。

对小鼠施用贫乏或富含磷酸盐的食谱改变了血清磷酸盐浓度，而且应当改变FGF23在甲状腺/甲状旁腺、心、或肝中的表达水平。高血磷应当升高FGF23 mRNA在这些组织中的表达，而低血磷应当降低FGF23 mRNA在这些组织中的表达。

将FGF23在雄性和雌性Hyp小鼠中的表达水平与正常同窝幼仔对照或具有磷酸盐改变食谱的同窝幼仔进行比较，其中所述Hyp小鼠在Phex基因中具有突变，而且是人X连锁低血磷佝偻病的鼠模型。Hyp小鼠应当具有升高的FGF23表达和血清浓度。

实施例5：FGF23在由肿瘤诱导的骨软化患者中的检测

本文的资料证实了FGF23检测方案用于诊断患者体内由肿瘤诱导的骨软化的用途。

由展示由肿瘤诱导的骨软化的临床症状的患者手术切除肿瘤。然后将肿瘤细胞在细胞培养瓶中培养48小时。使用标准方案由肿瘤细胞分离RNA。使用FGF23特异PCR引物对来自肿瘤的RNA进行RT-PCR。来自肿瘤的RNA扩增到适当大小的cDNA条带，而从在PCR之前未进行逆转录的肿瘤细胞RNA（阴性对照）未扩增到这样的cDNA。因此，在肿瘤样品中检测到FGF23 mRNA指示由肿瘤诱导的骨软化，从而用作这种疾病的有价值的诊断工具。

实施例6: FGF23对人的安全性

本文的资料证实了FGF23对人的安全性。

在患有由肿瘤诱导的骨软化的有些患者中，检测不到肿瘤。在用高剂量1,25-二羟基维生素D和磷酸盐进行治疗后，这些患者的状况得到改善。一旦这些患者体内的低血磷得到纠正，即不再有症状，尽管他们血液中的FGF23浓度仍然很高。在ADHR患者中也是如此，据推测，他们都具有高FGF23血清浓度，这是他们不能降解突变型FGF23所致。因此，高水平的FGF23对人没有明显的有害影响。

本文完整收入文中引用的每一篇专利、专利申请、和发表物的公开书作为参考。

尽管已经通过参考具体实施方案而公开了本发明，显然，本领域其它技术人员可以设计本发明的其它实施方案和变化，而不违背本发明的真实精神和范围。所附权利要求书意欲解释为包括所有这些实施方案和等同的变化。

<110> ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT, MÜNCHEN

<120> 新型成纤维细胞生长因子 (FGF23) 及其使用方法

<130> 053884-5001WO

<140> NOT YET ASSIGNED

<141> 2000-07-10

<150> 60/219,137

<151> 2000-07-19

<160> 34

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 1612

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

```

cggcaaaaag gaggaatcc agtctaggat cctcacacca gctacttga aggagaag  60
aaaggccag taaggcctgg gccaggagag tccgacagg agtctaggat tcaacttca 120
gcaccagcca ctacagacag ggcacgatgt tggaggcccg cctcaggctc tgggtctgtg 180
ccttgtcag cgtctgcagc atgagcgtcc tcaggccta tcacaatgoc tcccaactgc 240
tgggtccag ctgggtggc ctgatcacc tgtcacagc cacagccagg aacagctacc 300
acctcagat ccacagaat ggccatgtgg atggcgacc ccatcagacc atctacagt 360
ccctgatgat cagatcagag gatctgtgct tigtgtgat tacagggtg atgacagaa 420
gatacctctg catggatttc agaggcaaca ttttggatc acactatttc gaccggaga 480
actgcaggtt ccacacacag acgctgnaa acgggtacga cgttaccac tctctcagt 540
atcacttctt ggtcagcttg gcccgaggga agagagcttt cctgcagcgc atgaaccac 600
cccgctactc ccagtctctg tccggaggga acgagatccc cctaattcac ttacacccc 660
ccataccagc gggcacacc cggagcgctg aggaagactc ggagcgggac cccctgaacg 720

```


tgcgaagcc ccggcccg atgaccccg cccggccgc ctgtacag gagtccga 780
 gcgcgagga caacgccc atggccagt acccattagg ggtgtcagg ggcgtcag 840
 tgaacagca cgtcgggga accggcccg aaggctcgc cccctgcgc aagtcatc 900
 aggtgcctg gaaggcacc ctcttaacg cctccctag caacgcgc tcttccag 960
 gaccagctc ctgacgttc cggagtgga aaagtgaac gggcgtgta tggaaifgc 1020
 tctctctg ggtcccttc cacaggagt cctgtgaga ccaaccttg aggcccaag 1080
 catggggtt caccgcttc ctactccat atgaacaac ttcccaata ggaacacca 1140
 acaggtaac tagaaattc cctctatga aggtagagag aagggtctc tcccaaca 1200
 ttctcttc tigtgcctc cctcttaic actttaagc ataaaaaaa aaaaaaaa 1260
 aaaaaaaa aaagcagt ggttctgag ctcaagact tgaagggtg ggaagagga 1320
 aatcgagat ccagagctc tctccctgc cctatgatt tatgttagt gcccgatcc 1380
 cactgcatt tgagtgtca aacctgaac ttaacagct aatgggcaa gtgatgaan 1440
 aactacttt caagccttg tctctctg agcatctct gggaaagct gtcaaaagc 1500
 tgggttagg ctggtgaaa ctgacagct agactgaig ctgtgaaa tgaaggagga 1560
 atcataag aaactcgc ctccctacg ggtgagcac ttctgtgc ct 1612

<210> 2

<211> 251

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val
1 5 10 15

Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu
20 25 30

Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg
35 40 45

Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala
50 55 60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala
65 70 75 80

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met
85 90 95

Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn
 100 105 110
 Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His
 115 120 125
 Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala
 130 135 140
 Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg
 145 150 155 160
 Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg
 165 170 175
 His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val
 180 185 190
 Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln
 195 200 205
 Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu
 210 215 220
 Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240
 Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile
 245 250
 <210> 3
 <211> 1559
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 3
 agcctgtctg ggagtgctag attcaaacct cagctatgc cactcagtcg tgtcactgc 60
 tagggacctg ccttagactc ctggtggcg tgcctgcac tgcctgcagc ttggcactg 120
 ctgagocctc tccggacctc tcccatctg ttggctccaa ctggggaagc ctgaccacc 180
 ttatcacggc tacagccagg accagctatc acctacagat ccatagggat ggtctgtag 240
 atggaccccc cctcagacc atctacgtg cctgatgat tacatcagag gacgcgggt 300
 ctgtggtgat aacaggagcc atgactcgaa ggttccttg tatgactc caggcaaca 360
 tttttgac gtctactc agccagaga attgcaagtt ccgacgtg acgctgaga 420
 atggcatga cgtctactg tcgagaagc atcatacct ggtgagcctg ggccgcgca 480
 aggcactct ccagcgggc accaacccgc cgcctcttc ccagttctg gctgcagga 540

acgaggctcc gctgctgcat ttctacacgt ttgcgccagc ggcgcacacg cgcagcgccg 600
 aggaccacac ggagcgcgac caccgtaacg tctcaagcg gcggccccc gccacgctg 660
 tgcctgtatc ctgctctcgc gacgtccga ggcacagga aggtgcgcc cagccagcg 720
 atctctgg ggctctcgc agaggccg gtagtctcg cggggcgcg ggagcgcg 780
 atagggtcg ccccttccc aggttctct aggtcccg gccagctcg gtcgcctcc 840
 aicctcagt cggctcagc cactgagag aaggactag gtacctgag gatctctct 900
 tctctccc cctatggc ctgagagta cctgcaggt tccagccag caccgtatt 960
 cgaattag agccacggt gggaggctg agaggtgcg cagacagtc tcagcacca 1020
 caaatccg taattcag tcaggggga tcgtactca cacacacac catcacaca 1080
 cacacacac cacatcatg taattttaa tgttaactg atttaagac cccacaggt 1140
 aaatcgaca cgaagctct ttattttat ttactaaca ggttaaccag acactggcc 1200
 ttattagcc gggtctctg cctagcatt taatgaica gttagcaga ggaaagatt 1260
 cagcctga acacaggaa gaggccact ctgcagctc tagttactat totggattc 1320
 acgggtgtt gatttgagc acctgacct taattcttc actaggcaag tcgaagaag 1380
 acgcgcttt ctctcttg ggaagacti tggattggc ggagcctgac aaggacact 1440
 aaaccgaac catttcagc ttagcctcc ctgaggatg attgccaat gattctgtg 1500
 taggaccagt cagtagctt tgaattgac ctggctcagc aaagtacac ttgctagg 1559

<210> 4

<211> 251

<212> FRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Met Leu Gly Thr Cys Leu Arg Leu Leu Val Gly Val Leu Cys Thr Val
 1 5 10 15

Cys Ser Leu Gly Thr Ala Arg Ala Tyr Pro Asp Thr Ser Pro Leu Leu
 20 25 30

Gly Ser Asn Trp Gly Ser Leu Thr His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg
 35 40 45

Thr Ser Tyr His Leu Gln Ile His Arg Asp Gly His Val Asp Gly Thr
 50 55 60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Thr Ser Gln Asp Ala

65	70	75	80
Gly Ser Val Val Ile Thr Gly Ala Met Thr Arg Arg Phe Leu Cys Met			
85	90	95	
Asp Leu His Gly Asn Ile Phe Gly Ser Leu His Phe Ser Pro Glu Asn			
100	105	110	
Cys Lys Phe Arg Gln Trp Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr Leu			
115	120	125	
Ser Gln Lys His His Tyr Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ile			
130	135	140	
Phe Gln Pro Gly Thr Asn Pro Pro Phe Ser Gln Phe Leu Ala Arg			
145	150	155	160
Arg Asn Glu Val Pro Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Arg Pro Arg Arg			
165	170	175	
His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Pro Pro Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val			
180	185	190	
Leu Lys Pro Arg Pro Arg Ala Thr Pro Val Pro Val Ser Cys Ser Arg			
195	200	205	
Glu Leu Pro Ser Ala Glu Glu Gly Gly Pro Ala Ala Ser Asp Pro Leu			
210	215	220	
Gly Val Leu Arg Arg Gly Arg Gly Asp Ala Arg Gly Gly Ala Gly Gly			
225	230	235	240
Ala Asp Arg Cys Arg Pro Phe Pro Arg Phe Val			
245	250		

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser			
1	5	10	15

Asp

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

cgggatcac gatgtgggg gcccg

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 7

ggaattccta gatgaacttg gcgaa

25

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 8

ataccacggc agcacaccgg g

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 9

ccgggtatgc tgcgtggta t

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10
gggcacacc tggagcgcg a 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 11
tgggcgctcc aggtgtccg c 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 12
gggcacacc agagcgcga g 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 13
ctcggcgctc tgggtgtcc g 21

<210> 14

<211> 139

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 14

Leu Lys Gly Ile Val Thr Arg Leu Phe Ser Gln Gln Gly Tyr Phe Leu
1 5 10 15

Gln Met His Pro Asp Gly Thr Ile Asp Gly Thr Lys Asp Glu Asn Ser
20 25 30

Asp Tyr Thr Leu Phe Asn Leu Ile Pro Val Gly Leu Arg Val Val Ala
35 40 45

Ile Gln Gly Val Lys Ala Ser Leu Tyr Val Ala Met Asn Gly Glu Gly
50 55 60

Tyr Leu Tyr Ser Ser Asp Val Phe Thr Pro Glu Cys Lys Phe Lys Glu
65 70 75 80

Ser Val Phe Glu Asn Tyr Tyr Val Ile Tyr Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
85 90 95

Gln Gln Glu Ser Gly Arg Ala Trp Phe Leu Gly Leu Asn Lys Glu Gly
100 105 110

Gln Ile Met Lys Gly Asn Arg Val Lys Lys Thr Lys Pro Ser Ser His
115 120 125

Phe Val Pro Lys Pro Ile Glu Val Cys Met Tyr
130 135

<210> 15

<211> 139

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 15

Leu Lys Gly Ile Val Thr Arg Leu Tyr Cys Arg Gln Gly Tyr Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met His Pro Asp Gly Ala Leu Asp Gly Thr Lys Asp Asp Ser Thr
20 25 30

Asn Ser Thr Leu Phe Asn Leu Ile Pro Val Gly Leu Arg Val Val Ala
35 40 45

Ile Gln Gly Val Lys Thr Gly Leu Tyr Ile Ala Met Asn Gly Glu Gly
50 55 60

Tyr Leu Tyr Pro Ser Glu Leu Phe Thr Pro Glu Cys Lys Phe Lys Glu
65 70 75 80

Ser Val Phe Glu Asn Tyr Tyr Val Ile Tyr Ser Ser Met Leu Tyr Arg
85 90 95

Gln Gln Glu Ser Gly Arg Ala Trp Phe Leu Gly Leu Asn Lys Glu Gly
100 105 110

Gln Ala Met Lys Gly Asn Arg Val Lys Lys Thr Lys Pro Ala Ala His
115 120 125

Phe Leu Pro Lys Pro Leu Glu Val Ala Met Tyr
130 135

<210> 16

<211> 139

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 16

Leu Lys Gly Ile Val Thr Lys Leu Tyr Ser Arg Gln Gly Tyr His Leu
1 5 10 15

Gln Leu Gln Ala Asp Gly Thr Ile Asp Gly Thr Lys Asp Glu Asp Ser
20 25 30

Thr Tyr Thr Leu Phe Asn Leu Ile Pro Val Gly Leu Arg Val Val Ala
35 40 45

Ile Gln Gly Val Gln Thr Lys Leu Tyr Leu Ala Met Asn Ser Glu Gly
50 55 60

Tyr Leu Tyr Thr Ser Glu Leu Phe Thr Pro Glu Cys Lys Phe Lys Glu
65 70 75 80

Ser Val Phe Glu Asn Tyr Tyr Val Thr Tyr Ser Ser Met Ile Tyr Arg
85 90 95

Gln Gln Gln Ser Gly Arg Gly Trp Tyr Leu Gly Leu Asn Lys Gln Gly
100 105 110

Glu Ile Met Lys Gly Asn His Val Lys Lys Asn Lys Pro Ala Ala His
115 120 125

Phe Leu Pro Lys Pro Leu Lys Val Ala Met Tyr
130 135

<210> 17

<211> 139

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 17

Leu Lys Gly Ile Val Thr Lys Leu Phe Cys Arg Gln Gly Phe Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Ala Asn Pro Asp Gly Ser Ile Gln Gly Thr Pro Glu Asp Thr Ser
20 25 30

Ser Phe Thr His Phe Asn Leu Ile Pro Val Gly Leu Arg Val Val Thr
35 40 45

Ile Gln Ser Ala Lys Leu Gly His Tyr Met Ala Met Asn Ala Glu Gly
50 55 60

Leu Leu Tyr Ser Ser Pro His Phe Thr Ala Glu Cys Arg Phe Lys Glu
65 70 75 80

Cys Val Phe Glu Asn Tyr Tyr Val Leu Tyr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg
85 90 95

Gln Arg Arg Ser Gly Arg Ala Tyr Tyr Leu Gly Leu Asp Lys Glu Gly
100 105 110

Gln Val Met Lys Gly Asn Arg Val Lys Lys Thr Lys Ala Ala Ala His
115 120 125

Phe Leu Pro Lys Leu Leu Glu Val Ala Met Tyr
130 135

<210> 18

<211> 141

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 18

Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe
1 5 10 15

His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly Thr Val His Gly Thr Arg His Asp
20 25 30

His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu Phe Ile Ser Leu Ala Val Gly Leu
35 40 45

Ile Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu
50 55 60

Arg Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Lys Lys Leu Thr Arg Glu Cys Val Phe
65 70 75 80

Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Tyr Asn Asn Thr Tyr Ala Ser Thr Leu
85 90 95

Tyr Lys His Ser Asp Ser Glu Arg Gln Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys
100 105 110

Asp Gly Ser Pro Arg Glu Gly Tyr Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe
115 120 125

Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val Asp Pro Ser Lys Leu
130 135 140

<210> 19

<211> 141

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 19

Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe
1 5 10 15

His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp
20 25 30

His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu
35 40 45

Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu
50 55 60

Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Gly Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe
65 70 75 80

Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu
85 90 95

Tyr Lys His Val Thr Thr Gly Arg Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys
100 105 110

Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe
115 120 125

Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val Asp Pro Asp Lys Val
130 135 140

<210> 20

<211> 135

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 20

Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr
1 5 10 15

Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu
20 25 30

Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val
35 40 45

Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys
 50 55 60
 Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu
 65 70 75 80
 Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn
 85 90 95
 Trp Gln His Asn Gly Gln Met Tyr Val Ala Leu Asn Gly Tyr Gly Ala
 100 105 110
 Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe
 115 120 125
 Leu Pro Met Val Val His Ser
 130 135
 <210> 21
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 21
 Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln
 1 5 10 15
 Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu
 20 25 30
 Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly
 35 40 45
 Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn
 50 55 60
 Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Cys Asn Glu Asp Cys Asn
 65 70 75 80
 Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala
 85 90 95
 Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Glu Lys
 100 105 110
 Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Glu Lys Thr Ala
 115 120 125
 His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
 130 135
 <210> 22

<211> 150

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 22

Leu Gly Gly Ala Pro Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Cys Ala Thr Lys Tyr
1 5 10 15

His Leu Gln Leu His Pro Ser Gly Arg Val Asn Gly Ser Leu Glu Asn
20 25 30

Ser Ala Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ala Val Glu Val Gly Ile Val
35 40 45

Ala Ile Arg Gly Leu Phe Ser Gly Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Arg
50 55 60

Gly Arg Leu Tyr Ala Ser Glu His Tyr Ser Ala Glu Cys Glu Phe Val
65 70 75 80

Glu Arg Ile His Glu Leu Gly Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Arg Leu Tyr
85 90 95

Arg Thr Val Ser Ser Thr Pro Gly Ala Arg Arg Gln Pro Ser Ala Glu
100 105 110

Arg Leu Trp Tyr Val Ser Val Asn Gly Lys Gly Arg Pro Arg Arg Gly
115 120 125

Phe Lys Thr Arg Arg Thr Gln Lys Ser Ser Leu Phe Leu Pro Arg Val
130 135 140

Leu Asp His Arg Asp His
145 150

<210> 23

<211> 137

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 23

Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg
20 25 30

Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val
35 40 45

Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met
 50 55 60
 Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys
 65 70 75 80
 Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Glu His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser
 85 90 95
 Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly
 100 105 110
 Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu
 115 120 125
 Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
 130 135
 <210> 24
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 24
 Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly
 1 5 10 15
 Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg
 20 25 30
 Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg
 35 40 45
 Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met
 50 55 60
 Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys
 65 70 75 80
 Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser
 85 90 95
 Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr
 100 105 110
 Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu
 115 120 125
 Pro Met Ser Ala Lys Ser
 130
 <210> 25

<211> 130

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 25

Leu Leu Gly Ile Lys Arg Leu Arg Arg Leu Tyr Cys Asn Val Gly Ile
1 5 10 15

Gly Phe His Leu Gln Ala Leu Pro Asp Gly Arg Ile Gly Gly Ala His
20 25 30

Ala Asp Thr Arg Asp Ser Leu Leu Gln Leu Ser Pro Val Gln Arg Gly
35 40 45

Val Val Ser Ile Phe Gly Val Ala Ser Arg Phe Phe Val Ala Met Ser
50 55 60

Ser Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Pro Phe Phe Thr Asp Gln Cys Thr
65 70 75 80

Phe Lys Gln Ile Leu Leu Pro Asn Asn Tyr Asn Ala Tyr Gln Ser Tyr
85 90 95

Lys Tyr Pro Gly Met Phe Ile Ala Leu Ser Lys Asn Gly Lys Thr Lys
100 105 110

Lys Gly Asn Arg Val Ser Pro Thr Met Lys Val Thr His Phe Leu Pro
115 120 125

Arg Leu
130

<210> 26

<211> 130

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 26

Leu Val Gly Ile Lys Arg Gln Arg Arg Leu Tyr Cys Asn Val Gly Ile
1 5 10 15

Gly Phe His Leu Gln Val Leu Pro Asp Gly Arg Ile Ser Gly Thr His
20 25 30

Gln Gln Asn Pro Tyr Ser Leu Leu Gln Ile Ser Thr Val Gln Arg Gly
35 40 45

Val Val Ser Leu Phe Gly Val Arg Ser Ala Leu Phe Val Ala Met Asn
50 55 60

Ser Lys Gly Arg Leu Tyr Ala Thr Pro Ser Phe Gln Glu Glu Cys Lys
65 70 75 80

Phe Arg Glu Thr Leu Leu Pro Asn Asn Tyr Asn Ala Tyr Glu Ser Asp
85 90 95

Leu Tyr Gln Gly Thr Tyr Ile Ala Leu Ser Lys Tyr Gly Arg Val Lys
100 105 110

Arg Gly Ser Lys Val Ser Pro Ile Met Thr Val Thr His Phe Leu Pro
115 120 125

Arg Ile
130

<210> 27

<211> 144

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 27

Ser Pro Ser Gly Arg Arg Thr Gly Ser Leu Tyr Cys Arg Val Gly Ile
1 5 10 15

Gly Phe His Leu Gln Ile Tyr Pro Asp Gly Lys Val Asn Gly Ser His
20 25 30

Glu Ala Asn Met Leu Ser Val Leu Glu Ile Phe Ala Val Ser Gln Gly
35 40 45

Ile Val Gly Ile Arg Gly Val Phe Ser Asn Lys Phe Leu Ala Met Ser
50 55 60

Lys Lys Gly Lys Leu His Ala Ser Ala Lys Phe Thr Asp Asp Cys Lys
65 70 75 80

Phe Arg Glu Arg Phe Gln Glu Asn Ser Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala
85 90 95

Ile His Arg Thr Glu Lys Thr Gly Arg Glu Trp Tyr Val Ala Leu Asn
100 105 110

Lys Arg Gly Lys Ala Lys Arg Gly Cys Ser Pro Arg Val Lys Pro Gln
115 120 125

His Ile Ser Thr His Phe Leu Pro Arg Phe Lys Gln Ser Glu Gln Pro
130 135 140

<210> 28

<211> 137

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 28

Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser
1 5 10 15

Gln Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Gln
20 25 30

Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly
35 40 45

Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Lys Phe Tyr Leu Cys Met
50 55 60

Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu
65 70 75 80

Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met
85 90 95

Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Tyr Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg
100 105 110

Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe
115 120 125

Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro
130 135

<210> 29

<211> 139

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 29

Leu Ser Arg Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser
1 5 10 15

Gly Lys His Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala
20 25 30

Glu Asp Gly Thr Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Lys
35 40 45

Gly Ser Arg Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys
50 55 60

Met Asn Lys Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys

65 70 75 80
 Asp Cys Val Phe Thr Phe Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu
 85 90 95
 Gln Asn Ala Lys Tyr Gly Glu Trp Tyr Met Asn Phe Thr Arg Lys Gly
 100 105 110
 Arg Pro Arg Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His
 115 120 125
 Phe Met Lys Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr
 130 135

<210> 30

<211> 138

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 30

Leu Ser Arg Arg Gln Ile Arg Glu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15
 Gly Lys His Val Gln Val Thr Gly Arg Arg Ile Ser Ala Thr Ala Glu
 20 25 30
 Asp Gly Asn Lys Phe Lys Lys Leu Ile Val Gln Thr Asp Thr Phe Gly
 35 40 45
 Ser Arg Val Arg Ile Lys Gly Ala Glu Ser Glu Lys Tyr Ile Cys Met
 50 55 60
 Asn Lys Arg Gly Lys Leu Ile Gly Lys Pro Ser Gly Lys Ser Lys Asp
 65 70 75 80
 Cys Val Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Phe Gln
 85 90 95
 Asn Ala Arg His Glu Gly Trp Phe Met Ala Phe Thr Arg Gln Gly Arg
 100 105 110
 Pro Arg Gln Ala Ser Arg Ser Arg Gln Asn Glu Arg Glu Ala His Phe
 115 120 125
 Ile Lys Arg Leu Tyr Gln Gly Gln Leu Pro
 130 135

<210> 31

<211> 135

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 31

Gly Trp Gly Lys Ile Thr Arg Leu Gln Tyr Leu Tyr Ser Ala Gly Pro
 1 5 10 15
 Tyr Val Ser Asn Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ser Asp Gly Ser Val Asp
 20 25 30
 Cys Glu Glu Asp Gln Asn Glu Arg Asn Leu Leu Glu Phe Arg Ala Val
 35 40 45
 Ala Leu Lys Thr Ile Ala Ile Lys Asp Val Ser Ser Val Arg Tyr Leu
 50 55 60
 Cys Met Ser Ala Asp Gly Lys Ile Tyr Gly Leu Ile Arg Tyr Ser Glu
 65 70 75 80
 Glu Asp Cys Thr Phe Arg Glu Glu Met Asp Cys Leu Gly Tyr Asn Gln
 85 90 95
 Tyr Arg Ser Met Lys His His Leu His Ile Ile Phe Ile Gln Ala Lys
 100 105 110
 Pro Arg Glu Gln Leu Gln Asp Gln Lys Pro Ser Asn Phe Ile Pro Val
 115 120 125
 Phe His Arg Ser Phe Phe Glu
 130 135

<210> 32

<211> 139

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 32

Gly Trp Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro
 1 5 10 15
 His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val
 20 25 30
 Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala
 35 40 45
 Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr
 50 55 60
 Leu Cys Asn Gly Ala Asp Gly Lys Asn Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser
 65 70 75 80

Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn
85 90 95

Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala
100 105 110

Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His
115 120 125

Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu
130 135

<210> 33

<211> 136

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 33

Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala
1 5 10 15

Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly
20 25 30

Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu
35 40 45

Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu
50 55 60

Cys Gln Arg Glu Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro
65 70 75 80

Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val
85 90 95

Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys
100 105 110

Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro
115 120 125

Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu
130 135

<210> 34

<211> 145

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 34

Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser
 1 5 10 15

Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His
 20 25 30

Gly Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe
 35 40 45

Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe
 50 55 60

Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg
 65 70 75 80

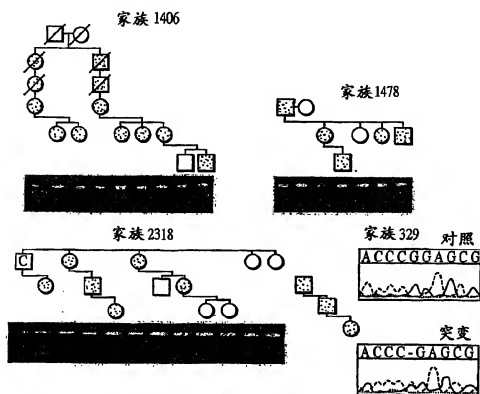
Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro
 85 90 95

Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu
 100 105 110

Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn
 115 120 125

Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr
 130 135 140

Arg
 145



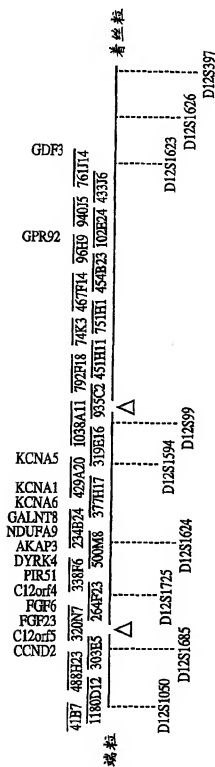


图 2

FGF12 LKG.IVT..RLFSQCG.....YFLQNHHPDGTIDGTRKDENSEDTLFLNLPVGLR. 114
 FGF14 LKG.IVT..RLYCRQG.....YFLQHPDGDALDGTKDDSTNTLFLNLPVGLR. 112
 FGF13 LKG.IVT..KLYSROG.....YHLQADGTIDGTRKDDSTNTLFLNLPVGLR. 110
 FGF11 LKG.IVT..KLFCROG.....FYLOANPDGSIQGTPEPTSSHTFLNLPVGLR. 112
 FGF16 LKG.ILRRRLQYCRTG.....FHLFIPMGTVGTRHDSRFGILEFISLAVG. 102
 FGF9 LKG.ILRRRLQYCRTG.....FHLFIPMGTVGTRHDSRFGILEFISLAVG. 103
 FGF10 LQG.DVRWKLFSFTX.....YFLKERNKGKVGTKKENCYPYILETFSVIG. 119
 FGF7 MEGGDIVRRLFCRTQ.....WYLDIDRKGKVGTKKENCYPYILETFSVIG. 106
 FGF3 LGGAPRR..KLYCATX.....YHLQHPSGRVGSLNS..AYSILETFAVEG. 84
 FGF1 PPGNYKKPILYCSNG.....GHFLRILPDGTVGTRDSDQILQLOSAEVEG. 67
 FGF2 PPGNFKDPKRLYCSNG.....GPFRLHDPDGRVDCVRKSDPHIKLOQAEVEG. 125
 FGF4 LLGKRL..RRLYCVGI...GFHLQALPDGRIGGAHDT..KDSLLELSPVEG. 124
 FGF6 LVGTRQ..RRLYCVGI...GFHLQALPDGRIGGAHDT..KDSLLELSPVEG. 126
 FGF5 SP.S.GRRRTGSLYCVG...IGFHLQIYDPDGKVGSHZAN..NLSVLLEIFAVSOG. 129
 FGF18 VSRQLRLYQLYSRTS...GKHQIQLV.GRRISARGEDGDYVAQLIVETTFGS 95
 FGF8 LSRLRLRYQLYSRTS...GKHVQVLANKRINAMAEZGDPAXLIVETTFGS 95
 FGF17 LSRRQIRRYQLYSRTS...GKHVQVTC..RRISATAEZGDPAXLIVETTFGS 95
 FGF15 GWKQITRLQYLYSAGPY.VSNCFKIRSDGSDVCEEDQN..ERNLLEFRAVALR. 95
 FGF19 GWGDFIRLRHLIYSGPHGLSSCFPRIRADGVVDCAQGS..AHSLLLEIKAVLR. 88
 FGF21 QFGGVQRYLYTDDAQT..EAHLREDDGTVGGAQGS..PESLLOLKATKPG. 89
 FGF23 SWGG...LIELYATARN.S.YHLQIHKNHGVHDGAPHQT.IYSALMIRSDAG. 81

图 3A

PGF12	VVAIQGVKASLVAMNGGGLYSSDV.FTPECKFKXSVPENYYVYSSLY...	164
PGF14	VVAIQGVKTGLYIAMNGGGLYPSSEL.FTPECKFKXSVPENYYVYSSLY...	162
PGF13	VVAIQGVTKLILAMNNGGLYTSSEL.FTPECKFKXSVPENYYVYSSLY...	160
PGF11	VVTIQSAKLGHYHAMNAGLLYSSPH.FTACRFKFCVPEENYYVYSSLY...	162
PGF16	LVSIRGDSGLYGMNKGELYGSKK.LTRCCVFRQCPENWYVYSSLY...	152
PGF9	LVSIRGVDGLYGMNKGELYGSEK.LTQCCVFRQCPENWYVYSSLY...	153
PGF10	VVAVKAMSNVYLAMNKGKLYGSKE.FNNDCKLKRKEENGINTYASFW...	169
PGF7	IYAIKGVSESEYLAMNKGKLYAKKE.CNEDCNFKELILEHINTYASAKW...	156
PGF1	IYAIRGFSGRYLAMNKGRLYASEH.YSACEPVRIRHELGYNTYASLYRTV	137
PGF2	EVIKRSFTGQYLAMTDGLYGSQT.PNEECPLFRRLLENHYNTYISKKH...	117
PGF4	VVISIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKC.VTDECFPPERLESNNYNTYRSKY...	175
PGF6	VVISIFGVARSPFVAMSSKGLYGSFP.FTDECTPFEILLPNNYNAVESKY...	174
PGF5	IYGLRGVPSNVELAMNKGKLYATPS.FQRECKFATLLPNNYNAVESLY...	176
PGF18	QVRIKGETTFPLCNMNRKGLYKPDGTSKECVPIEKVLNNYFALMSAKY...	182
PGF8	RVRIRGAEITGLYICMNRKGLIYKPSGKSKDCVPIEVLNNYFALQWAKY...	146
PGF17	RVRIRGAESEYICMNRKGLIYKPSGKSKDCVPIEVLNNYFALQWAKY...	146
PGF15	TVAIKGVH SVRYLCMSADGKIYGLIYSEEDCTPFEEMDCLGYIQYRSHKH...	146
PGF19	TVAIKGVH SVRYLCMSADGKMGLIYSEEDCAPFEELPDGYNVYRSEKH...	139
PGF21	VVIQILGVKTSRPLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSPFELLEDDGYNVYQSEAH...	140
PGF23	FVVI TGVMHSRRLYLCMDPFGNIYFGSHYFDPENCRFQHTLENGYDVYHSPQYHFL	135

图 3B

FGF12RQDESGRWFLGLNKKEGQIMKGN..RVKXKTPSSHFVPKPIEVCMY 208
 FGF14RQDESGRWFLGLNKKEGQAMKGN..RVKXKTPAAHFPLPDLKVANY 206
 FGF13RQQSGRGWVLGLNKEGIMKGN..HVKKMKPAAHFPLPDLKVANY 204
 FGF11RRRSGRWVLGLDKEGQVMKGN..RVKXKAAAHFPLKLLKVANY 206
 FGF16KESDSERQIYVALNKDGSPPREGY..RTKRHKQKFTHFPLRPVDSKLL 196
 FGF9KHVDTGRIYVALNKDGTREGT..KTKRHKQKFTHFPLRPVDSKLV 197
 FGF10QHNGRQNYVALNGKAPRRGQ..KTKRKNTSAHFPLPVVHS-- 208
 FGF7THNGGFMFVALNGKIPVRGK..KTKKQKXIAHFPLMAIT---- 194
 SSTPGARRQPSAERLWYVSUNGKGRPRGP..KTRRTQKSSLFPLPVLDRDH 188
 FGF3AENWVFGLKNGSCRRGP..KTRRTQKSSLFPLPVLDRDH 188
 FGF1PSWYVALKRTGQYKLGK..KTHYGQKAILFPLPVSSD-- 155
 FGF2PGMFIALSKNGTKKGN..KTPGQKAILFPLMSAKS-- 210
 FGF4QCTYIALSKYGVKRGK..KVSPTMKVTHFPLRL----- 206
 FGF5GZEWYVALNKRGAKRGSBRVKQHIETHFLEFKQSEQP 208
 FGF18SCWYVGFTKIGRPRGCP..KTRNQDQVHFMRYPKGQP. 225
 FGF8EGWYHAFTRGGRPRGKS..KTRHQQRVHFMRYPKGHT. 183
 FGF17EGWYHAFTRGGRPRGKS..KTRHQQRVHFMRYPKGHT. 184
 FGF15HLHIFIQA.PREQL....QDQKPSNFIVFHSSPFE 179
 FGF19RLPVSLSSAK.QRQLY..KNRGFLPLSHFLDMLPVPEE 175
 FGF21GLPHELPGKSPHRDP....AR.GPARFLPGLPGAPFAL 174
 FGF23VSL.....GRAKRAFLPGMPPPYQSPLSRRMEIPLHFNTFIPRRHTR 179
¹⁰.....¹¹.....¹²

图 3C

图 4A



图 4B

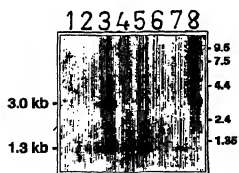


图 5A

CGGCAAAAGGAGGGAATCCAGTCTAGGATCCTCACACCAGCTACTTGC
 AAGGGAGAAGGAAAAGCCAGTAAGGCCTGGGCCAGGAGAGTCCCGACA
 GGAGTGTCAAGTTTCAATCTCAGCACCAAGCCACTCAGAGCAGGGCAGGA
 TGTGGGGGCCCGCCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCCTTGTGACGCTCTG
 CAGCATGAGCGTCTCAGAGCCTATCCCAATGCCTCCCCACTGTCTGGC
 TCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACACAGCCACAGCCAGGAACA
 GCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCATGTGGATGGCGCACCCCA
 TCAGACCATCTACAGTGCCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTT
 GTGGTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGCATGGATTTC
 GAGGCAACATTTTTGGATCACACTATTTCGACCCGGAGAACTGCAGGTT
 CCAACACCAGACGCTGGAACACGGGTACGACGTCTACCACTCTCCTCAG
 TATCACTTCCTGGTCAGTCTGGGCGGGGCAAGAGAGCCTTCCTGCCAG
 GCATGAACCCACCCCGTACTCCAGTTCCCTGTCCCGAGGAACGAGAT
 CCCCCTAATTCACTTCAACACCCCATACCAAGGCGGCACACCCGGAGC
 GCCGAGGACGACTCGGAGCGGGACCCCTGAACGTGCTGAAGCCCGGG
 CCGGATGACCCCGGCCCGGCTCTGTTCACAGGAGCTCCCGAGCGC
 CGAGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCATTAGGGGTGGTCAGGGC
 GGTGAGTGAACACGACGCTGGGGGAACGGGCCCGGAAGGCTGCCGCC
 CCTTCGCAAGTTCACTAGGGTCTGCTGGAAGGGCACCCCTCTTTAACC
 ATCCCTCAGCAACGACAGCTCTTCCCAAGGACCAGGTCCTTGACGTTT
 CGAGGATGGGAAGGTGACAGGGGCATGTATGGAATTTGTGCTTCTCT
 GGGGTCCCTTCCACAGGAGGTCCTGTGAGAACCACTTTGAGGCCCAA
 GTCATGGGGTTTACCGCCTTCTCACTCCATATAGAACACCTTTCCCA
 ATAGGAACCCCAACAGGTAACTAGAAATTTCCCTTTCATGAAGGTAG
 AGAGAAGGGTCTCTCCCAACATATTTCTCTTCTTGTGCCTCTCCTCT
 TTATCACTTTTAAGCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 GCAGTGGGTCTCTGAGCTCAAGACTTTGAAGGTGTAGGGAAGAGGAAT
 CGGAGATCCAGAAGCTTCTCCACTGCCCTATGCATTTATGTTAGATGC
 CCGATCCCACTGGCATTGAGTGTGCAACCTTGACATTAAACAGCTGA
 ATGGGGCAAGTTGATGAAAACTACTTTCAAGCCTTCGTTCTTCTTG
 AGCATCTCTGGGGAAGAGCTGTCAAAGACTGGTGGTAGGCTCGTGAAA
 ACTTGACAGCTAGACTTGATGCTTGCTGAAATGAGGCAGGAATCATAA
 AGAAACTCAGCCTCCCTACAGGGTGAGCACCTTCTGTCTCGCT

图 5B

MLGARLRLWVCALCSVCSMSVLRAYPNASPLLGSWSGGLIHLYTATARN
SYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYL CMDF
RGNI FGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLP
GMNPPPYSQFLSRRNEIPLIHFNTPIPRRHTRSAEDDSERDPLNVLKPR
ARMT PAPASC SQELPSAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNT HAGGTGPEGCR
PFAKFI

图6A

AGCCTGTCTGGGAGTGTCTCAGATTTCAAACCTCAGCATTAGCCACTCAGTG
 CTGTGCAATGCTAGGGACCTGCCTTAGACTCCTGGTGGGCGTGTCTCTGC
 ACTGTCTGCAGCTTGGGCACTGTCTAGAGCCTATCCGGACACTTCCCCAT
 TGCTTGCTCCAACCTGGGAAGCCTGACCCACCTGTACACGGCTACAGC
 CAGGACCAGCTATCACCTACAGATCCATAGGGATGGTCATGTAGATGGC
 ACCCCCCATCAGACCATCTACAGTGCCCTGTATGATTACATCAGAGGACG
 CCGGCTCTGTGGTGATAACAGGAGCCATGACTCGAAGGTTCCCTTTGTAT
 GGATCTCCACGGCAACATTTTTGGATCGCTTCACTTCAGCCCAGAGAAT
 TGAAGTTTCGCCAGTGGACGCTGGAGAATGGCTATGACGTCTACTTGT
 CGCAGAAGCATCACTACCTGGTGAGCCTGGGCGCGCCAAAGCGCATCTT
 CCAGCCGGGCACCAACCGCGCCCTTCTCCAGTTCTCTGGCTCGCAGG
 AACGAGGTCCTCGCTGTCTGCATTTCTACTGTTCCGCCACGGCGCCACA
 CGCGCAGCGCCGAGGACCCACCGAGCGCGACCCACTGAACGTGTCTCAA
 GCCGCGGCCCGCGCCAACGCTGTGCTGTATCCTGTCTCTCGCAGCTG
 CCGAGCGCAGAGGAAGGTGGCCCGCAGCCAGCGATCCTCTGGGGGTGC
 TGCGCAGAGGCGGTGGAGATGCTCGCGGGGCGCGGGAGGCGCGGATAG
 GTGTGCCCCCTTTCCAGGTTCTGTCTAGGTCCTCCAGGCCAGGCTGCGTC
 CGCCTCCATCTCCAGTCGGTTCAGCCCACGTAGAGGAAGGACTAGGGT
 ACCTCGAGGATGTCTGCTTCTCTCCCTTCCCTATGGGCCTGAGAGTCAC
 CTGCGAGGTTCCAGCCAGGCACCGCTATTGAGAATTAAGGCCAACGGT
 GGGAGGCTGGAGAGGTGGCGCAGACAGTTCTCAGCACCCACAATACTCT
 GTAATTCTAGCTCCAGGGGAATCTGTACTCACACACACACATCCACA
 CACACACACACACATACATGTAATTTTAAATGTTAATCTGATTTAAA
 GACCCCAACAGGTAACCTAGACACGAAGCTCTTTTATTTTATTTTACT
 AACAGGTAACACAGACACTTGGCCTTTATTAGCCGGGTCTCTTGCCCTAG
 CATTTTAAATCGATCAGTTAGCAGGAGGAAGAGTTCACGCCTTGAACAC
 AGGGAAGAGGCCATCTCTGCAGCTTCTAGTTACTATTCTGGGATTACG
 GGTGTTTGAGTTTGAGCACCTTGACCTTAATGTCTTCACTAGGCAAGTC
 GAAGAAAGACGCGCATTTCTTCTCTTTGGGAAGAGCTTTGGATTGGCGG
 GAGGCTGACAAGGACACCTAAACCGAACACATTTCAGAGTTACGCCTCC
 CTGAGGAATGATTCGCCAATGATTCTGTATAGGACCAGTCAGTAGCTT
 TTGAATTTGCCCTGGCTCAGCAAAGTCTACCTTGCTAGGG

图 6B

MLGTCLRLLVGVLC TVCSLGTARAYPDTSPLLGSNWGS LTHLYTATART
SYHLQIHRDGHVDGTPHQTIYSALMITSEDAGSVVITGAMTRRFLCMDL
HGNIFGSLHFSFENCKFRQWTLNGYDVYLSQKHHYLVSLGRAKRIFQP
GTNPPPFSSQFLARRNEVPLLHFYTVRPRRHTRS AEDPPERDPLNVLKPR
PRATFVPVSCSRELPSAERGGPAASDPLGVLRGRGDARGGAGGADRCR
PFPRFV

图 7A

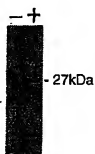


图 7B

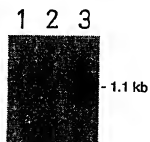


图 7C

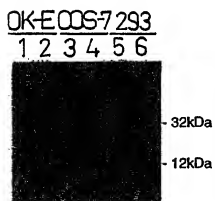


图8A

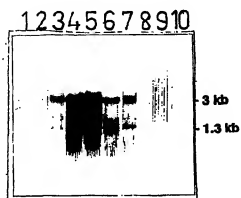
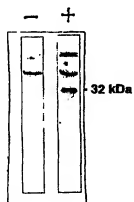


图8B



← 预测的信号序列
 NLGRLILNVCALGCVCSMSVLRAYPNASPLLGSSWGGLIHLYTATARNSY
 HLQIHKNGHVDGAPHQTIIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLQMDFRGNI
 FGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLFGMNPPP
 YSOFLSRRNEIPLIHFNTPIP**R**HT**R**SAEDDDSERDPIINVILKPRARMTPA
 176 179
 PASCQELPSAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNTHAGGTGPEGCRPFKFI

← 预测的蛋白酶切割位点

图 9

图 10A

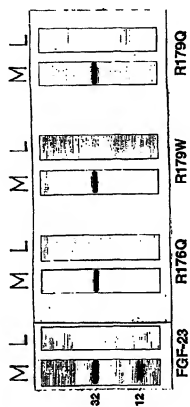


图10B

↓

天然 : PIP**R**RHT**R**SAEDD
 176 179

R176Q: PIP**Q**HT**R**SAEDD
 176 179

R179W: PIP**R**RHT**W**SAEDD
 176 179

R179Q: PIP**R**RHT**Q**SAEDD
 176 179

图 11A

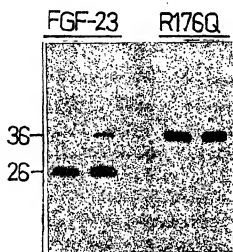


图 11B

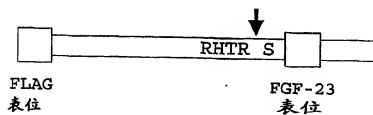


图 12A

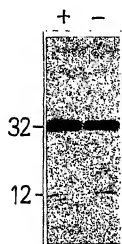


图 12B



图 13

